



MEDICAL SCHOOL  
LIBRARY









# Zeitschrift für Immunitätsforschung und experimentelle Therapie I. Teil: Originale

unter Mitwirkung von

**H. Apolant**, Frankfurt a. M., **M. Ascoli**, Catania, **V. Babes**, Bukarest, **O. Bail**, Prag,  
**E. F. Bashford**, London, **E. v. Behring**, Marburg, **S. Belfanti**, Mailand, **A. Besredka**,  
Paris, **J. Bordet**, Brüssel, **A. Breinl**, Liverpool, **L. Brieger**, Berlin, **A. Calmette**, Lille,  
**A. Dieudonné**, München, **R. Doerr**, Wien, **M. Dorset**, Washington, **E. v. Dungern**,  
Heidelberg, **P. Ehrlich**, Frankfurt a. M., **S. Flexner**, New York, **U. Friedemann**,  
Berlin, **P. Frosch**, Berlin, **G. Gaffky**, Berlin, **M. von Gruber**, München, **M. Hahn**,  
Königsberg i. Pr., **A. Heffter**, Berlin, **L. Hektoen**, Chicago, **M. Jacoby**, Berlin, **C. O.**  
**Jensen**, Kopenhagen, **S. Kitasato**, Tokio, **W. Kolle**, Bern, **W. Kruse**, Bonn, **K. Land-**  
**stelner**, Wien, **C. Levaditi**, Paris, **L. von Liebermann**, Budapest, **F. Loeffler**, Greifs-  
wald, **Th. Madsen**, Kopenhagen, **C. J. Martin**, London, **E. Metschnikoff**, Paris, **L.**  
**Michaelis**, Berlin, **R. Muir**, Glasgow, **C. Moreschi**, Pavia, **P. Th. Müller**, Graz,  
**M. Neisser**, Frankfurt a. M., **F. Neufeld**, Berlin, **F. Nuttall**, Cambridge, **R. Oster-**  
**tag**, Berlin, **R. Paltauf**, Wien, **A. Pettersson**, Stockholm, **R. Pfeiffer**, Breslau, **E. P.**  
**Plek**, Wien, **P. Römer**, Marburg, **C. J. Salomonsen**, Kopenhagen, **A. Schattenfroh**,  
Wien, **Cl. Schilling**, Berlin, **Th. Smith**, Boston, **G. Sobernheim**, Berlin, **V. C. Vaughan**,  
Ann Arbor, **A. v. Wassermann**, Berlin, **W. Weichardt**, Erlangen, **A. Wladimiroff**,  
St. Petersburg, **A. E. Wright**, London, **D. Zabolotny**, St. Petersburg

herausgegeben von

**E. FRIEDBERGER**  
(Berlin.)

**R. KRAUS**  
(Wien.)

**H. SACHS**  
(Frankfurt a. M.)

**P. UHLENHUTH**  
(Straßburg i. E.)

**Dreizehnter Band.**

Mit 7 Figuren und 9 Kurven im Text.



**Jena**  
**Verlag von Gustav Fischer**  
1912



---

Alle Rechte vorbehalten.

---

UNIVERSITY OF CALIFORNIA  
LIBRARY

## Inhaltsverzeichnis.

### Heft 1. (Ausgegeben am 20. April 1912.)

	Seite
<b>Ottolenghi, Donato</b> , Ueber die Wirkung der Säuren, der Basen und einiger Salze auf die bakteriziden Sera. [Aus dem Institut für Hygiene der Königl. Universität Siena (Vorstand: Prof. A. Sclavo)] . . . . .	1
<b>Izar, G., und Fagnoli, A.</b> , Ueber die giftige Wirkung von Organlipoiden. II. Mitteilung. Giftigkeit methylalkoholischer Hodenextrakte. [Aus dem Institut für spezielle Pathologie innerer Krankheiten der k. Universität Catania (Vorstand: Prof. M. Ascoli)] .	31
<b>Kling, Carl A.</b> , Ueber die elektrische Erregbarkeit der motorischen Nerven während des anaphylaktischen Zustandes. [Aus der bakteriologischen Abteilung der Staatsmedizinischen Anstalt (Vorsteher: Prof. A. Pettersson) und der pädiatrischen Klinik des Karolinischen Instituts (Chef: Prof. O. Medin) Stockholm] . .	43
<b>Ritz, H.</b> , Ueber die Wirkung des Cobragiftes auf die Komplemente. III. Mitteilung. Zugleich ein Beitrag zur Kenntnis der hämolytischen Komplemente. [Aus der experimentell-biologischen Abteilung (Prof. H. Sachs) des Königl. Institutes für experimentelle Therapie in Frankfurt a. M. (Direktor: Wirklicher Geheimer Rat Professor P. Ehrlich)] . . . . .	62
<b>Dean, H. R.</b> , The Relation between the Fixation of Complement and the Formation of a Precipitate. [From the Bacteriological Department Lister Institute, London] . . . . .	84
<b>Ströbel, H.</b> , Ueber das Anaphylatoxin Friedbergers . . . . .	123
<b>Lurà, Angelo</b> , Bemerkung zu vorstehenden Ausführungen . . . . .	124
<b>Kapsenberg, G.</b> , Zu meiner Arbeit „Studien über Immunität und Zellerfall“. (Diese Zeitschrift, Bd. 12, 1912, Heft 5.) . . . . .	125

24578

**Heft 2. (Ausgegeben am 4. Mai 1912.)**

	Seite
<b>Friedberger, E., und Kumagai, Taizo,</b> Ueber hämolytische und bakterienabtötende Wirkung chemisch indifferenten und unlöslicher anorganischer kolloidaler Substanzen. [Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin; Direktor: Geheimrat Prof. Dr. A. Heffter (Abteilung für Immunitätsforschung und experimentelle Therapie, Leiter: Prof. Dr. E. Friedberger)] .	127
<b>Liefmann, Cohn, M., und Orloff,</b> Ueber die Hypothese der lipoiden Natur des Komplementes. [Aus der Bakteriologischen Abteilung des Rudolf-Virchow-Krankenhauses zu Berlin (Leiter: Priv.-Doz. Dr. Liefmann)] . . . . .	150
<b>Schmidt, W. A.,</b> Ueber ein Präzipitin, welches es ermöglicht, auch gekochtes (unlösliches) Eiweiß zu differenzieren. [Aus dem chemischen und gerichts-chemischen Laboratorium der Government School of Medicine, Kairo, Aegypten] . . . . .	166
<b>Poppe,</b> Die Säureagglutination der Bakterien der Paratyphusgruppe. [Aus der Veterinär-Abteilung des Kaiserlichen Gesundheitsamtes]	185
<b>Aoki,</b> Ueber die Beziehung zwischen Komplementbindung und hämolysehemmender Wirkung von Serum normaler und infizierter Tiere. [Aus dem Institut für Hygiene und Bakteriologie der Universität Straßburg (Direktor: Geheimrat Prof. Dr. Uhlenhuth).] Mit 8 Kuren im Text . . . . .	192
<b>Dold, H., und Aoki, K.,</b> Ueber die Bildung von Anaphylatoxin aus Streptokokken, Meningokokken, Gonokokken, B. mallei, B. pestis, B. pneumoniae Friedländer, B. Paratyphus B, Bacillen der Hühnercholera, des Schweinerotlaufs, Hefe Busse, Aktinomyces, Pilzsporen, Spirochäten der Hühnerspirillose und der russischen Recurrens. [Aus dem Institut für Hygiene und Bakteriologie der Universität Straßburg (Direktor: Geheimrat Prof. Dr. Uhlenhuth)]	200
<b>Freund, H.,</b> Bemerkung zu der Arbeit von McIntosh, Fildes und Dearden: Salt fever and the treatment of Syphilis by "606" (Bd. 12 dieser Zeitschrift). [Aus der Medizinischen Klinik zu Heidelberg.] Mit 1 Kurve im Text . . . . .	213
<b>Weil, Richard,</b> Bemerkungen zur Arbeit von Dr. P. Kuschakoff: „Zur Frage über die Verwertung der Widerstandsfähigkeit menschlicher Erythrocyten gegenüber Cobragift für die Diagnose der Syphilis“. [Aus dem Departement of Experimental Therapeutics, Cornell University Medical School, New York City, U.S.A.] . .	216

**Heft 3. (Ausgegeben am 11. Mai 1912.)**

<b>Altmann, Karl,</b> Ueber Immunisierung mit ambozeptorbeladenen Blutkörperchen. [Aus dem Königl. Institut für experimentelle Therapie zu Frankfurt a. M. (Direktor: Wirklicher Geheimer Rat Prof. Dr. P. Ehrlich). Experimentell-biologische Abteilung (Prof. Dr. H. Sachs)] . . . . .	219
--	-----



	Seite
<b>Meyer, K. F.</b> , Notes on the Chemotherapeutic Treatment of the Biliary Fever in Dogs . . . . .	231
<b>Boehneke, K. E.</b> , Beiträge zur Kenntnis der bakteriziden Komplemente. [Aus dem Königl. Institut für experimentelle Therapie zu Frankfurt a. M. (Direktor: Wirkl. Geh. Rat Prof. Dr. P. Ehrlich)] . . . . .	240
<b>Römer, Paul H.</b> , Weiterer Beitrag zur Frage der Haltbarkeit heterologen Antitoxins im Organismus. [Aus dem Institut für Hygiene und experimentelle Therapie zu Marburg (Direktor: Wirkl. Geh. Rat Prof. Dr. v. Behring)] . . . . .	252
<b>Römer, Paul H.</b> , Antitoxin und Eiweiß. [Aus dem Institut für Hygiene und experimentelle Therapie zu Marburg (Direktor: Wirkl. Geh. Rat Prof. Dr. v. Behring)] . . . . .	260
<b>Ball, Oskar, und Kleinhans, F.</b> , Versuche über die Wirkungsweise des Streptokokkenserums. [Aus der Serologischen Abteilung des Hygienischen Institutes und der gynäkologischen Klinik der deutschen Universität Prag] . . . . .	283

#### Heft 4. (Ausgegeben am 1. Juni 1912.)

<b>Marxer, A.</b> , Zur Toxinbildung des Milzbrandbacillus. [Aus der bakteriologischen Abteilung der chem. Fabrik auf Aktien (vorm. E. Schering), Berlin] . . . . .	309
<b>Graetz, Fr.</b> , Experimentelle Studien zur Theorie und Praxis der Eiweißdifferenzierung. [Aus dem Staatlichen Hygienischen Institut zu Hamburg; Direktor: Prof. Dr. Dunbar (Abteilung für experimentelle Therapie und Immunitätsforschung)] . . . . .	329
<b>Peschlé, S.</b> , Versuche über die Wirkungsweise des Atoxyls. [Aus dem Institut zur Erforschung der Infektionskrankheiten der Universität Bern (Direktor: Prof. Dr. W. Kolle)] . . . . .	364
<b>Sachs, H.</b> , Ueber Ausflockung von Mastixemulsionen. [Aus dem Königl. Institut für experimentelle Therapie in Frankfurt a. M. (Direktor: Wirklicher Geheimer Rat Prof. Dr. P. Ehrlich)] . .	374
<b>Messerschmidt, Th.</b> , Zur Technik der Agglutination. [Aus dem Institut für Hygiene und Bakteriologie der Universität Straßburg i. E. (Direktor: Geheimrat Prof. Dr. Uhlenhuth).] Mit 3 Figuren im Text . . . . .	378
<b>Rosenthal, Eugen</b> , Versuche, Antigen- und Antikörperbeeinflussungen sichtbar zu machen. Experimentelle Studien mit der Epiphaninreaktion. I. Mitteilung. [Mitteilung aus dem Hygienisch-bakteriologischen Institut der Universität Erlangen, exp.-biologische Abteilung (Prof. Dr. Wolfgang Weichardt). und aus dem chemisch-biologischen Laboratorium der IV. Abteilung des St. Rochus-Spitals der Haupt- und Residenzstadt Budapest (Prof. Dr. Stephan v. Tóth).] Mit 4 Figuren im Text . . .	383

## VI

## Inhaltsverzeichnis.

	Seite
<b>Landsteiner, Karl, und Prašek, Emil,</b> Ueber die bindenden und immunisierenden Substanzen der Blutkörperchen. [Aus der Prosektur der k. k. Wilhelminenspitales in Wien] . . . . .	403
<b>Heft 5. (Ausgegeben am 22. Juni 1912.)</b>	
<b>Rastaedt, Hans,</b> Beitrag zur Frage der bakteriziden Eigenschaften entzündlicher Exsudate. [Aus dem Hygienischen Institute der Königl. Tierärztl. Hochschule zu Berlin (Vorstand: Geh. Med.-Rat Prof. Dr. Frosch)] . . . . .	421
<b>Distaso, A.,</b> Sur la putréfaction intestinale. II. Mémoire. [Bacteriological Department of the Royal Institute of Public Health, London] . . . . .	440
<b>Umnus, Otto,</b> Die photobiologische Sensibilisierungstheorie in der Pellagrafrage. [Aus dem Hygienischen Institute der Königl. Tierärztl. Hochschule zu Berlin (Direktor: Geh. Medizinalrat Prof. Dr. Frosch)] . . . . .	461
<b>Bauer, Felix,</b> Kutanreaktion und Komplement. [Aus dem Karolinen-Kinderspital in Wien (Dirig. Primararzt Doz. Dr. Knöpfelmacher)] . . . . .	486
<b>Bernstein, E. P., and Kaliski, David J.,</b> The Use of Formalinized Sheep Cells in Complement-Fixation tests . . . . .	490
<b>Miyaji, S.,</b> Ueber den Einfluß von Leukocyten und Leukocyten-extrakten auf die Anaphylatoxinbildung. [Aus dem Hygienischen Institute in Graz (Vorstand: Prof. Dr. W. Prausnitz)] . . . .	496
<b>Ssoblew, Nicolas,</b> Versuche über Isolierung des bakteriolytischen Immunkörpers. [Aus dem Königl. Institut für Infektionskrankheiten zu Berlin (Direktor: Geh. Obermed.-Rat Prof. Dr. Gaffky; Abt.-Vorsteher: Geh. Med.-Rat Prof. Dr. v. Wassermann)] . .	507
<b>Coca, Arthur F.,</b> "Vaccination" in Cancer. I. Vaccination in Human Cancer in the light of the experimental data upon normal tissue and tumor immunity. [From the Department of Experimental Pathology in Cornell University Medical College, under the Huntington Cancer Research Fund of the General Memorial Hospital, New York] . . . . .	524
<b>Coca, Arthur F., Dorrance, G. M., and Lebrede, M. G.,</b> "Vaccination" in Cancer. II. A Report of the results of the vaccination therapy as applied in 79 cases of Human Cancer. [From the Research Laboratory of the H. K. Mulford Company in Philadelphia, Pa., and the Research Laboratory of the Department of Sanitation of Cuba, in Havana] . . . . .	543
<b>Haendel, L.,</b> Bemerkungen zu der Arbeit von Graetz: „Experimentelle Studien zur Theorie und Praxis der Eiweißdifferenzierung“ . . .	585

**Heft 6.** (Ausgegeben am 6. Juli 1912.)

	Seite
<b>v. Klecki, Carl</b> , Ueber den Einfluß der Radium-Emanation auf die Phagocytose von Bakterien. [Aus dem Institut für allgemeine und experimentelle Pathologie der Jagellonischen Universität in Krakau] . . . . .	589
<b>De Waele, Henri</b> , Le rôle des acides aminés dans l'intoxication protéinique. L'anaphylaxie est due à l'intervention des acides aminés et du complément. [Travail des Laboratoires de Physiologie et de Bactériologie et Hygiène de l'Université de Gand] . . . . .	605
<b>Dold, H., und Ogata, Sagio</b> , Weitere Studien über die wässerigen Organextraktgifte. [Aus dem Institut für Hygiene und Bakteriologie der Universität Straßburg (Direktor: Geheimrat Prof. Dr. Uhlenhuth)] . . . . .	667
<b>Stern, Margarete</b> , Ueber die Brauchbarkeit der Bariumsulfatbehandlung von Leichenseren zwecks serodiagnostischer Untersuchung. [Aus der Königlichen dermatologischen Klinik zu Breslau (Direktor: Geheimrat Prof. Dr. Neisser, zurzeit stellvertretender Direktor: Prof. Dr. C. Bruck)] . . . . .	688
<b>v. Liebermann, L., und v. Fenyvessy, B.</b> , Bemerkungen zu der Abhandlung von Liefmann, M. Cohn und Orloff: Ueber die Hypothese der lipoiden Natur des Komplements. [Aus dem Hygienischen Institut der Universität zu Budapest (Prof. L. v. Liebermann)] . . . . .	695



## Autorenverzeichnis.

---

- |                                     |                                |
|-------------------------------------|--------------------------------|
| Altmann 219.                        | Liefmann, Cohn und Orloff 150. |
| Aoki 192.                           | Lurà 124.                      |
| Bail und Kleinhans 283.             | Marxer 309.                    |
| Bauer, F. 486.                      | Messerschmidt 378.             |
| Bernstein und Kaliski 490.          | Meyer, K. F. 231.              |
| Boehneke 240.                       | Miyaji 496.                    |
| Coca 524.                           | Ottolenghi 1.                  |
| Coca, Dorrance und Lebrede 543.     | Peschié 364.                   |
| Dean 84.                            | Poppe 185.                     |
| Distaso 440.                        | Rastaedt 421.                  |
| Dold und Aoki 200.                  | Ritz 62.                       |
| Dold und Ogata 667.                 | Römer, P. H. 252, 260.         |
| Freund, H. 213.                     | Rosenthal, E. 383.             |
| Friedberger und Kumagai 127.        | Sachs, H. 374.                 |
| Graetz 329.                         | Schmidt, W. A. 166.            |
| Haendel 585.                        | Ssobolew 507.                  |
| Izar und Fagiuoli 31.               | Stern, Margarete 688.          |
| Kapsenberg 125.                     | Ströbel, H. 123.               |
| v. Klecki 589.                      | Umnus 461.                     |
| Kling 43.                           | De Waele 605.                  |
| Landsteiner und Prašek 403.         | Weil, R. 216.                  |
| v. Liebermann und v. Fenyvessy 695. |                                |
-

# Zeitschrift f. Immunitätsforschung. Originala. Bd. XIII. No. 1.

*Nachdruck verboten.*

[Aus dem Institut für Hygiene der Königl. Universität Siena  
(Vorstand: Prof. A. Sclavo).]

## Ueber die Wirkung der Säuren, der Basen und einiger Salze auf die bakteriziden Sera <sup>1)</sup>.

Von Dr. Donato Ottolenghi <sup>2)</sup>,  
Dozent und Oberassistent.

(Eingegangen bei der Redaktion am 2. Januar 1912.)

Zu den in gegenwärtiger Arbeit beschriebenen Untersuchungen wurde ich durch die Beobachtung veranlaßt, daß man das sonst unvermeidliche Aussterben von Milzbrandbacillen und -sporen, welche in gewissen geeigneten Dosen in bakterizide Sera gesät wurden, dadurch verhindern kann, daß man diesen Seris etwas Glykose zusetzt. Wenn die Zahl der eingesäten Keime eine derartig große ist, daß sie nicht alle durch das Serum abgetötet werden können, dann äußert sich der günstige Einfluß der Glykose, wie ich bereits anderswo hervorgehoben habe, durch eine lebhaftere und raschere Entwicklung der nicht zugrunde gegangenen Bakterien. Wenn man an Stelle einer kleinen Menge einer sporen- und bacillenhaltigen Kultur entweder nur Sporen oder Bacillen sät, so beobachtet man — wie wir weiter unten besser sehen werden — daß die Sporen, auch wenn sie in sehr spärlicher Menge eingesät werden, im bakteriziden Serum mit Zusatz von Glykose reichliche Kulturen liefern, während die Bacillen unter denselben Verhältnissen dasselbe Resultat nur dann ergeben, wenn sie in nicht zu geringem Quantum eingesät werden.

Baumgarten und Walz und später Finkh <sup>3)</sup> hatten bereits beobachtet, daß der Zusatz einer geringen Menge Peptons und einer kleinen Menge Zucker zum Kaninchenblutserum die Vermehrung des

1) Nach einer in der R. Accademia dei fisiocritici in Siena bei der Sitzung am 29. Juli 1911 gemachten Mitteilung.

2) Ins Deutsche übertragen von Dr. med. K. Rühl (Turin).

3) Centralbl. f. Bakt., Orig., Bd. 28, 1900, p. 694.

Milzbrandbacillus befördert; diese Autoren haben aber keine Erklärung dieser Erscheinung vorgeschlagen.

Meine Untersuchungen über die Bedeutung des Zuckers für das Leben und für einige Funktionen des Milzbrandbacillus und die zahlreichen Beobachtungen anderer Autoren über die zuckervergärende Tätigkeit dieses Keimes legten mir die Annahme nahe, daß bei der hier zu besprechenden Erscheinung die Entstehung von Säuren auf Kosten der Glykose und die darauffolgende Einwirkung der Säuren auf die bakteriziden Eigenschaften der Sera, welche Eigenschaften durch die Säuren paralysiert werden können, die Hauptrolle spielen.

In der Tat hat v. Lingelsheim beobachtet<sup>1)</sup>, daß, wenn man dem Kaninchenserum soviel Essigsäure zusetzt, daß es auf Lackmus nicht mehr alkalisch reagiert, die milzbrandbacillentötende Wirkung fast gänzlich verschwindet. Diese Beobachtung wurde von Gruber und Takaki bestätigt<sup>2)</sup> und entspricht gewissermaßen den Ergebnissen einiger Versuche von Werbitzki<sup>3)</sup> über die Wirkung, welche der Zusatz von Essigsäure zu den Extrakten von Blutplättchen in inaktiviertem Pferdeblutserum ausübt.

Bei dem Durchlesen der Arbeiten der genannten Forscher und derjenigen von Hegeler<sup>4)</sup> und von Schneider<sup>5)</sup> über den Einfluß der Säuren auf die auf vom Milzbrandbacillus verschiedene Keime ausgeübte Bakterizidie machte es mir den Eindruck, als wären die bisher gesammelten Kenntnisse, welche sich besonders auf die einfache Wahrnehmung beschränken, daß einige Sera imstande sind, die bakteriziden Sera zu inaktivieren, zu spärlich und fragmentarisch, besonders wenn man sie mit den zahlreichen und wichtigen Untersuchungen vergleicht, welche in neuerer Zeit von Ehrlich, Morgenroth und Sachs<sup>6)</sup>, von Noguchi<sup>7)</sup>, Moruzzi<sup>8)</sup>, Rondoni<sup>9)</sup>, Amako<sup>10)</sup> u. a. m. über die Wirkung der Säuren und der Basen auf die hämolytischen Sera, und von den genannten Autoren und von Schmidt<sup>11)</sup> und Abramow<sup>12)</sup> über die Wirkung der Säuren und Basen auf die präzipitierenden Sera ausgeführt wurden.

- 1) Zeitschr. f. Hygiene, Bd. 37, 1901, p. 131.
- 2) Deutsche med. Wochenschr., 1907, No. 39.
- 3) Zeitschr. f. Hygiene, Bd. 68, 1911, p. 63.
- 4) Arch. f. Hygiene, Bd. 40, 1901, p. 375.
- 5) Arch. f. Hygiene, Bd. 70, 1909, p. 40.
- 6) Berl. klin. Wochenschr., 1899, No. 22, und 1902, No. 14/15.
- 7) Biochem. Zeitschr., Bd. 6, p. 172.
- 8) Biochem. Zeitschr., Bd. 27, p. 498.
- 9) Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 7, 1910, p. 515.
- 10) Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 8, 1910, p. 168.
- 11) Biochem. Zeitschr., Bd. 24, p. 45.
- 12) Zeitschr. f. Immunitätsforsch., Bd. 8, 1910, p. 145.



Dieser Eindruck und der Gedanke, es sei zweckmäßig, die Behauptung Pirennes<sup>1)</sup> zu kontrollieren, daß man die gewöhnliche bakterizide Substanz der Sera deutlich von jener besonders differenzieren kann, welche auf den Milzbrandbacillus einwirkt, veranlaßten mich dazu, die Versuche auszuführen, über deren Resultate ich, soweit ich solche bisher erhalten habe, im folgenden berichten werde.

## I.

Zur Untersuchung der Wirkung der Säuren kann man jedes beliebige mit bakteriziden Eigenschaften versehene Serum benutzen; ich habe besonders Serum von gegen den Milzbrandbacillus immunisierten Eseln, Pferdeserum und Kaninchenserum angewendet.

Das Serum immunisierter Esel eignet sich infolge seiner starken Aktivität und seiner geringen Empfindlichkeit gegen das Veralten ganz besonders zur Erzielung genauerer Resultate und zur Ausführung einigermaßen zahlreicher Reihen von Versuchen.

Meine Experimente führte ich meistens folgendermaßen aus: in eine Reihe von Reagenzgläsern wurde eine gewisse Menge des Serums getan, welchen dann eine bestimmte Menge einer titrierten Lösung der zu untersuchenden Säure, oder, zur Kontrolle, ein gleiches Volumen destillierten Wassers zugesetzt wurde; dann wurden die einzelnen Gemische mit einer und derselben Menge von Milzbrandbacillen oder -sporen (im Durchschnitt 4500 Bacillen oder 10—12000 Sporen) infiziert. Die Röhren wurden danach in den Thermostaten bei 37° C gestellt und hin und wieder untersucht, um festzustellen, nach welcher Zeitfrist die gesäten Keime so weit vermehrt waren, daß ihre Entwicklung mit bloßem Auge oder durch die mikroskopische Untersuchung einer Oese des Gemisches erkennbar war.

Die Sporen wurden aus wenigstens einem Monat alten Kulturen gewonnen, in destilliertem Wasser aufgeschwemmt, durch Papier filtriert, 3 Minuten lang auf 80° C erwärmt und dann benutzt. Auf diesem Wege kann man, wie ich, mit den neueren Bestimmungen Fischöders<sup>2)</sup> übereinstimmend, nachweisen konnte, wahre und echte Aufschwemmungen reiner Sporen erhalten. Die Erwärmung auf 80° C kann zwar nicht ganz unschädlich für die Sporen sein; ich muß jedoch gleich hervorheben, daß ich bei meinen Versuchen sowohl mit auf 80° erwärmten wie mit keiner Erwärmung ausgesetzten Sporen dieselben Resultate erhielt, vorausgesetzt, daß es sich in letzterem Falle tatsächlich nur um Sporen handelte, oder wenigstens, daß die Zahl der vegetativen Formen eine ganz unbedeutende war.

1) Centralbl. f. Bakt., Orig., Bd. 36, 1904, p. 256.

2) Centralbl. f. Bakt., Orig., Bd. 51, 1909, p. 320.

Die Bacillen zur Aussaat wurden durch Besäung von Bouillon mit Sporen gewonnen; diese Bouillonkultur wurde benutzt, als die mikroskopische Untersuchung ergab, daß eine Entwicklung stattgefunden hatte, d. h. nach 3—4-stündigem Verweilen der Kultur bei 37° C. Bei diesem Verfahren ist natürlich nicht die Möglichkeit ausgeschlossen, daß im Augenblick der Besäung der Sera noch einzelne Sporen unverändert geblieben waren; der Verlauf der Versuche zeigte aber, daß diese Möglichkeit eine sehr geringe war und keine große Bedeutung hatte.

In der Tabelle I sind die Resultate eines Versuches dargestellt, den ich in der soeben angegebenen Weise mit Eselserum, mit einer  $\frac{1}{10}$ -Normallösung von Milchsäure und mit einer 10-proz. Lösung von Glykose ausführte.

Tabelle I.

				Aussaat	
				Bacillen	Sporen
Serum 1 ccm	+	Milchsäure 0,01 ccm	—	nach 8 Tagen	+ nach 6 Tagen
" 1 "	+	" 0,05 "	—	" 8 "	+ " 36 Stund.
" 1 "	+	" 0,1 "	+	" 20 Stund.	+ " 24 "
" 1 "	+	" 0,2 "	+	" 24 "	+ " 24 "
" 1 "	+	" 0,5 "	—	" 8 Tagen	— " 8 Tagen
" 1 "	+	Glykose 0,05 "	—	" 8 "	+++ " 8 "
" 1 "	+	" 0,1 "	—	" 8 "	+++ " 5 "
" 1 "	+	" 0,5 "	—	" 8 "	+ " 4 "
" 1 "	+	Wasser 0,1 "	—	" 8 "	— " 8 "
" 1 "	+	" 0,5 "	—	" 8 "	++ " 6 "

+ = mit bloßem Auge erkennbare Entwicklung.

++ = reichliche Entwicklung.

+++ = sehr reichliche Entwicklung.

— = keine Entwicklung (selbst bei Untersuchung unter dem Mikroskop).

Aus diesem Versuch, welcher als Beispiel aus einer ganzen unter denselben Verhältnissen ausgeführten Reihe von Experimenten dienen kann, kann man einige interessante Schlußfolgerungen ziehen.

In erster Linie sieht man, daß es, bei Anwendung von Eselserum, ein Optimum der Konzentration der Milchsäure (0,1—0,2 ccm der  $\frac{1}{10}$ -Normallösung auf 1 ccm des Serums) gibt, bei welchem sich sowohl die Bacillen wie die Sporen so lebhaft entwickeln, daß die Entwicklung bereits nach 24-stündiger Inkubation deutlich erkennbar ist.

Aus der Tabelle ersieht man ferner, daß kleine Mengen Milchsäure genügen, um die Entwicklung der Sporen, aber nicht diejenigen der Bacillen, zu befördern, und daß andererseits

der Zusatz allzu großer Säuremengen, trotz der Verdünnung, welche das Serum dadurch erfährt und welche eine Abschwächung der bakteriziden Tätigkeit zur Folge hat, sowohl die Entwicklung der Sporen wie diejenige der Bacillen hemmt.

Man sieht auch noch, daß auch die Anwesenheit der Glykose, obwohl diese bei weitem nicht eine so starke Wirkung wie die Milchsäure entfaltet, die Entwicklung der Sporen befördert, während hingegen sie keinen Einfluß auf die Entwicklung der Bacillen ausübte. Diesbezüglich ist aber, wie ich bereits erwähnt habe, zu bemerken, daß die Resultate je nach der Menge der gesäten Bacillen und je nach der Kraft des Serums verschieden sind, und zwar infolge der Möglichkeit, daß die Glykose, wenn in den Seris solange lebende Bacillen anwesend bleiben, wie es zur Erzeugung der nötigen Menge von Säuren notwendig ist, eine Inaktivierung der Sera bewirken kann.

Hier drängt sich die Frage auf, in welcher Weise die Sporen die Glykose verwerten, um dem Serum gegenüber die Oberhand zu nehmen. Es wäre jedenfalls nicht undenkbar, daß die Sporen selbst auf die Glykose einwirken und Säuren erzeugen; diese Annahme steht sogar meines Erachtens vollständig im Einklang mit den Schlußfolgerungen, welche Effront<sup>1)</sup> aus einigen seinen Versuchen über die Wirkungen der Sporen in verschiedenen Nährsubstraten gezogen hat und welche in dem Sinne lauten, daß keine Unterdrückung, sondern nur eine Verlangsamung resp. Abschwächung der Lebenserscheinungen eintritt. In unserem Fall kann man die Erscheinung jedoch auch durch die Annahme erklären, daß nach der Einführung der Sporen in das Serum zuerst nur ein Teil derselben keimt, welcher während seines kurzen Lebens die Glykose nur wenig angreift, während die Sporen, welche später, d. h. zu einer Zeit kommen, wo das Serum infolge des Veraltens und der bereits geschehenen Entstehung kleiner Säuremengen einen Teil seiner Aktivität eingebüßt hat, länger leben und den noch später keimenden Sporen eine üppige Entwicklung ermöglichen werden.

Und daß die Sporen im Serum tatsächlich nicht alle auf einmal keimen, kann man durch verschiedene Verfahren nach-

1) *Moniteur scientif.*, 1907.

weisen, welche auch Fischöder bei seinen Untersuchungen über die Keimung und Sporenbildung des Milzbrandbacillus angewendet hat.

Die einfachste und beweiskräftigste Methode besteht darin, daß man beobachtet, was bei 37° C mit Sporen geschieht, welche in einem hängenden Serumtropfen gesät werden, und zwar vorzugsweise von sehr aktivem Serum, weil hier die Keimung langsamer vor sich geht, so daß die verschiedenen Stadien der Erscheinung besser verfolgt werden können. Man wird in diesem Fall beobachten, daß die Sporen, welche gewöhnlich eine leichte Brownesche Bewegung zeigen, während einer gewissen Zeit ihre Form und ihren Glanz beibehalten; daß dann zuerst einige ihre Gestalt rasch verändern, d. h. rundlicher werden, sich an einem Ende öffnen und durch die Oeffnung einen kurzen Keim aussenden, während die übrigen Sporen ganz unverändert erscheinen und erst später dieselben Umwandlungen zeigen, wie diejenigen, die frühzeitig keimten. Zuweilen ist die Zahl der spät keimenden Sporen eine winzig kleine; in anderen Fällen, besonders wenn es sich um sehr aktive Sera (Antimilzbrand-Eselserum) handelt, beginnt hingegen bei einem großen Teil der Sporen die Keimung erst sehr spät, d. h. nach mehrstündigem Verweilen bei 37° C.

Diese verschiedene Raschheit im Keimen kann man auch folgendermaßen nachweisen. Man besät mehrere, eine gewisse Menge aktiven Serums enthaltende Röhrchen mit einer gleichen Menge einer Aufschwemmung von vorher während 3 Minuten auf 80° C erwärmten Sporen; dann erwärmt man nach verschiedenen Zeitabständen eines der Röhrchen während 1 Stunde auf 55° C, um alle vegetativen Formen abzutöten, ohne die noch unveränderten Sporen zu beschädigen, und legt dann mit diesem Material eine Plattenkultur auf Agar an. In den verschiedenen, auf diesem Wege hergestellten Plattenkulturen, zählt man nun die entwickelten Kolonien auf, und gewinnt somit — wenn man eine Agglutination der Sporen von seiten des betreffenden Serums ausschließen kann — Anhaltspunkte über den Verlauf der Keimung in den verschiedenen Röhren. Es handelt sich bei solchen Resultaten jedenfalls nur um eine Annäherung, und zwar nicht so sehr infolge der Agglutinationsphänomene, welche meistens so schwach sind, daß es ziemlich

gut gelingt, sie durch tüchtiges Schütteln der Serumproben vor der Anlegung der Plattenkulturen zu beseitigen, als vielmehr, weil die 1-stündige Erwärmung auf  $55^{\circ}\text{C}$  oder jede andersartige Erwärmung zwecks Abtötung der vegetativen Formen nicht ohne Einfluß auf die Sporen sein kann, besonders wenn bei diesen bereits der Keimungsprozeß begonnen hat.

Bei einem meiner Versuche mit Serum eines immunisierten Esels wurden ungefähr 12000 Sporen gesät und sofort einer 1-stündigen Erwärmung auf  $55^{\circ}\text{C}$  ausgesetzt, wonach ihre Zahl ungefähr auf 4000 herabsank; bei einem Versuche mit demselben Serum, welches bei Beginn des Experimentes dieselbe Anzahl von Sporen enthielt und erst nach 24 Stunden auf  $55^{\circ}\text{C}$  erwärmt wurde, fand ich hingegen nur ungefähr 200 Kolonien, was beweist, daß inzwischen ein großer Teil der Sporen gekeimt hatte. Auch wenn man spärliche Sporen aussät, kann man im Antimilzbrandserum nach 8—10 Tagen lebende Sporen finden; es ist aber schwer zu entscheiden, ob es sich um die eingesäten Sporen handelt, denn auch in diesem so stark bakteriziden Serum kann ein Teil der eingesäten Sporen, wie wir bald sehen werden, keimen, so daß man nicht die Möglichkeit ausschließen kann, daß die neugebildeten Bacillen ihrerseits Sporen erzeugen.

Wie dem auch sei, ich wollte hier nur betonen, daß die in die aktiven Sera eingeführten Sporen nicht alle zu gleicher Zeit keimen, weil hierin, nach meiner Ansicht, die Ursache des Einflusses zu suchen ist, den die Glykose auf das bakterizide Vermögen dieser Sera gegenüber den Sporen ausübt.

## II.

Wenn man einige Sera mit Milzbrandsporen besät und durch von Zeit zu Zeit angelegte Agarplattenkulturen das Verhalten der Sporen verfolgt, so beobachtet man, wie gesagt, daß die Zahl der auf den Platten sich entwickelnden Kolonien mit dem Fortdauern des Kontaktes zwischen Sporen und Sera mehr oder minder rasch abnimmt, als ob die Sera ein zuweilen sehr hohes, sporizides Vermögen besäßen. Wenn aber das Serum eine gewisse Menge Milchsäure enthält, dann scheint diese sporentötende Wirkung zu fehlen, indem man

in den Agarplatten entweder keine oder eine geringere Abnahme der Kolonien beobachtet als im vorigen Fall. Es genügt aber, die Serumproben 1 Stunde lang auf 55° C — zu dem Zwecke, in den Platten die der Zahl der Sporen wirklich entsprechende Anzahl von Kolonien zu erhalten — zu erwärmen, um wahrzunehmen, daß, wie aus Tabelle II und III hervorgeht, jener Unterschied zwischen einfachem Serum und angesäuertem Serum, in bezug auf die sporentötende Wirkung, nur ein anscheinender war.

Ist daraus zu schließen, daß die Säuren das bakterizide Vermögen und nicht das sporizide Vermögen paralisieren? Besteht aber dieses sporizide Vermögen auch in Wirklichkeit?

Tabelle II.

Milchsäure n/10, Saat: ungefähr 6000 Sporen, während 3 Minuten auf 80° C erwärmt.

									Kolonien
Eselser.	0,9 ccm + Wasser	0,1 ccm nach 6 Std. bei 37° C							56
"	0,9 " + "	0,1 " " 6 " " 37° " u. 1 Std. bei 55° C							2
"	0,9 " + Milchsäure	0,1 " " 6 " " 37° "							250
"	0,9 " + "	0,1 " " 6 " " 37° " " 1 " " 55° "							1
Kan.-Ser.	0,9 " + Wasser	0,1 " " 6 " " 37° "							0
"	" 0,9 " + "	0,1 " " 6 " " 37° " " 1 " " 55° "							0
"	" 0,9 " + Milchsäure	0,1 " " 6 " " 37° "							17
"	" 0,9 " + "	0,1 " " 6 " " 37° " " 1 " " 55° "							1

Tabelle III.

Milchsäure n/10, Saat: ungefähr 30000 Sporen, während 3 Minuten auf 80° C erwärmt.

									Kolonien
Eselser.	0,8 ccm + Wasser	0,2 ccm nach 6 Std. bei 37° C							600
"	0,8 " + "	0,2 " " 6 " " 37° " u. 1 Std. bei 55° C							160
"	0,8 " + Milchsäure	0,2 " " 6 " " 37° "							mehr als 30 000
"	0,8 " + "	0,2 " " 6 " " 37° " u. 1 Std. bei 55° C							60
Kan.-Ser.	0,8 " + Wasser	0,2 " " 6 " " 37° "							500
"	" 0,8 " + "	0,2 " " 6 " " 37° " " 1 " " 55° "							27
"	" 0,8 " + Milchsäure	0,2 " " 6 " " 37° "							mehr als 30 000
"	" 0,8 " + "	0,2 " " 6 " " 37° " u. 1 Std. bei 55° C							120

Die ersten Versuche, welche ich zur Lösung dieser Frage ausführte, hatten zunächst den Zweck, durch Plattenkulturen festzustellen, ob die Sporen in sehr aktiven Seris (von immunisiertem Esel und Kaninchen) leicht und zahlreich keimen, und ob somit die Abnahme der Zahl der Kolonien infolge der Behandlung der Sporen mit dem Serum auf die Abtötung der neugebildeten Bacillen oder auf die direkte Sporentötung

zurückzuführen ist. Die Resultate dieser Versuche waren aber sehr unklar, wie z. B. aus Tabelle III zu ersehen ist, aus welcher man ebensogut schließen kann, daß fast alle Sporen im Eselserum innerhalb 6 Stunden gekeimt haben und daß die Keime größtenteils abgetötet wurden, wie daß fast alle Sporen getötet wurden und daß die Keime der wenigen überlebenden Sporen, nachdem die Kraft des Serums abgeschwächt war, anfangen, sich zu vermehren.

Ich entschied mich deshalb dazu, durch Frischpräparate und gefärbte Präparate direkt zu untersuchen, wie sich die Sporen verhielten, die in die aktiven Sera mit und ohne Zusatz von Milchsäure gesät wurden. Da bereits Fischöder Untersuchungen in dieser Richtung, wenn auch nur mit einfachem Serum ausgeführt hat, will ich mich hier darauf beschränken, das wenige zu erwähnen, was für meine gegenwärtige Arbeit von Interesse ist. Die Versuche wurden folgendermaßen ausgeführt:

Ich stellte eine ziemlich dicke Aufschwemmung von Sporen in Wasser her und bereitete zu gleicher Zeit Sera mit Zusatz verschiedener Mengen von Milchsäure (meistens 10–20 Proz. der  $\frac{1}{10}$ -Normallösung); dann brachte ich auf eine Reihe von Deckgläschen je einen Tropfen Serums, mit welchem eine Oese der Sporenaufschwemmung gemischt wurde; danach drehte ich die Gläschen um, legte sie auf weite hohle Objektträger und stellte diese in die feuchte Kammer bei 37° C. Von Zeit zu Zeit untersuchte ich dann einige dieser Präparate, ließ sie dann austrocknen und färbte sie zuerst warm mit der Löfflerschen Methylenblaulösung und dann während einiger Sekunden kalt mit Safranin, welches, indem es das Serum rot färbte, die blau gefärbten Bakterien deutlicher hervortreten ließ.

Zu diesen Versuchen benutzte ich Esel- und Kaninchenserum; die Resultate waren, abgesehen von der langsamen Keimung im Eselserum, bei den beiden Sera gleich.

In folgender Tabelle findet man ein ganz typisches Beispiel.

Tabelle IIIa.

24 Stunden altes Kaninchenserum, Temperatur 37°.

Serum + 10 Proz. Milchsäure ( $n/_{10}$ )	Serum + 10 Proz. Wasser
sofort: sehr wenige Sporen sind blau gefärbt	sofort: sehr wenige Sporen sind blau gefärbt
nach 30 Minuten: zahlreiche blau gefärbte, von einem hellen Hof umgebene Sporen; bei einigen Sporen erscheint die blau gefärbte Substanz in zwei gleich Massen geteilt	nach 30 Minuten: zahlreiche dunkelblau gefärbte, von einer dünnen Schicht rotgefärbter Substanz umgebene Sporen; andere Sporen haben dasselbe Aussehen wie diejenigen im Serum mit Zusatz von Milchsäure

nach 3 Stunden: alle Uebergangsformen von den durch Löfflers Methylenblaulösung leicht färbaren Sporen bis zu den Fäden aus 1—2 Segmenten

nach 3 Stunden: ungefähr derselbe Befund wie nach 30 Minuten: in vielen Sporen erweist sich die blau färbbare Substanz als aus mehr oder minder weit voneinander abstehenden Massen, von feinsten blaß gefärbten Körnchen gebildet

nach 5 Stunden: zahlreiche Fäden aus 2—5 und mehr Segmenten; einzelne Reste von Sporen und einzelne Sporen wie nach 30 Minuten.

nach 5 Stunden: Befund wie nach 3 Stunden, mit dem Unterschiede, daß man vereinzelte kurze Bacillenfäden beobachtet.

Nach 5—6 Stunden beim Kaninchenserum und nach 18—24 Stunden beim Serum immunisierter Esel nehmen die gekeimten Bacillen, auch bei Abwesenheit von Milchsäure, gegenüber dem Serum die Ueberhand und fangen an, sich lebhaft zu vermehren, so daß sie mit ihren ineinander geflochtenen Fäden den ganzen Tropfen einnehmen. Zwischen den im hängenden Tropfen und den mit größeren Serummengen in Reagenzröhrchen ausgeführten Versuchen besteht also der Unterschied, daß sich im ersten Fall die Aktivität des Serums viel rascher als im zweiten abschwächt. Was aber hier besonderes Interesse darbietet und aus Tabelle IIIa deutlich hervorgeht, das ist, daß auch im hängenden Tropfen jene besondere Wirkung der Säuren auf die Sera zutage tritt, welche ich vorher erwähnte, und besonders daß diese Wirkung nicht den ersten Teil des Verhaltens der Sporen in den Seris, sondern nur ihre spätere Evolution beeinflußt. In der Tat, die Sporen zeigten stets in jedem Serum, sowohl mit wie ohne Zusatz von Milchsäure, zuerst jene anfänglichen Keimungsstadien, welche vor allem durch den Verlust der Refrangibilität, die Zunahme des Volumens und die Veränderung der Form und der Tingierbarkeit charakterisiert sind; ein Unterschied zwischen dem aktiven und dem mit Säuren behandelten, d. h. inaktivierten — denn die erwärmten Sera verhalten sich wie Sera mit Zusatz von Säuren — Serum tritt erst in den sukzessiven Stadien, ich möchte sagen zur Zeit des Höhepunktes der Keimung zutage, und besteht darin, daß im angesäuerten Serum die Keime ungestört austreten und sich vermehren können, während dies durch das aktive Serum mehr oder minder gehemmt wird.



Da somit die Aktivität der Sera, wie wir soeben sahen und wie bereits Fischöder beobachtet hatte, sich nicht gegen die intakten Sporen entfaltet, sondern gegen die Sporen, welche begonnen haben, zu keimen, also gegen Elemente, die ihrer Widerstandsfähigkeit, ihrer Tingibilität und ihren morphologischen Charakteren nach mehr als Bacillen denn als Sporen zu betrachten sind, muß man zugeben, daß man keinen Unterschied zwischen der tötenden Wirkung der Sera auf die Sporen und der tötenden Wirkung auf die Bacillen<sup>1)</sup> annehmen kann, und daß infolgedessen auch die Wirkung der Säuren auf die Entwicklung sowohl der Milzbrandbacillen wie der Milzbrandsporen in den bakteriziden Seris eine und dieselbe, d. h. eine einzige sein muß.

### III.

Die inaktivierende Wirkung auf die Sera übt nicht nur die Milchsäure aus, sondern mehrere andere Säuren besitzen, wie aus Tabelle IV ersichtlich ist, dieselbe Eigenschaft.

Tabelle IV.

Die Säuren wurden in  $n_{10}$ -Lösung angewendet. Zwischen dem Zusatz der Säure zum Serum und der Besäung ließ man 20 Minuten verlaufen.

Eiweißserum		Bacillen	Sporen
0,9 ccm + 0,1 ccm Wasser	—	nach 8 Tag.	— nach 8 Tag.
0,8 " + 0,2 "	—	8	8
0,9 " + 0,1 " Ameisensäure	+	" 18 Std.	Spuren " 18 Std.
0,8 " + 0,2 "	++	" 18 "	+" 18 "
0,9 " + 0,1 " Essigsäure	++	" 18 "	+" 5 Tag.
0,8 " + 0,2 "	++	" 18 "	++ " 18 Std.
0,9 " + 0,1 " Milchsäure	++	" 18 "	++ " 6 Tag.
0,8 " + 0,2 "	+	" 18 "	+" 18 Std.
0,9 " + 0,1 " Oxalsäure	++	" 18 "	+" 18 "
0,8 " + 0,2 "	++	" 18 "	++ " 3 Tag.
0,9 " + 0,1 " Salzsäure	++	" 18 "	+" 42 Std.
0,8 " + 0,2 "	+++	" 42 "	++ " 18 "

1) Diese Schlußfolgerung steht auch im Einklang mit den Beobachtungen Halbans über die Wirkung der Sera auf die Sporen des *Bacillus subtilis* (Ann. Inst. Pasteur, 1898, p. 417).

Es sei jedoch sofort bemerkt, daß man den Unterschieden zwischen Säure und Säure, die sich aus dieser Tabelle ergeben, keine zu große Bedeutung zuschreiben muß; diese Unterschiede sind nicht nur nicht konstant, sondern fehlen zuweilen gänzlich. Hiermit ist natürlich noch nicht gesagt, daß alle Säuren mit gleicher Intensität wirken, sondern nur, daß die angewendete Technik sich mehr dazu eignet, uns qualitative als quantitative Anhaltspunkte über die hier in Frage stehende Erscheinung zu liefern.

Dagegen ergibt sich aus obiger Tabelle mit Sicherheit, daß alle verschiedenen Säuren, wenn sie in einer zwischen  $n/_{10}$  und  $n/_{100}$  schwankenden Konzentration zugesetzt werden, eine, wenn auch nicht gleich starke, inaktivierende Wirkung auf die Sera ausüben, was, in anderen Worten gesagt, bedeutet, daß es zur Abschwächung des bakteriziden Vermögens nicht notwendig ist, die Sera vollständig zu neutralisieren, sondern es genügt, ihre natürliche Alkaleszenz etwas herabzusetzen.

Von den verschiedenen Fragen, welche durch diese Beobachtungen ins Feld gedrängt wurden, schienen mir zwei von besonderem Interesse.

Die erste war folgende: ob die inaktivierende Wirkung der Säuren mit ihrer Kraft zusammenhängt. Ein einfaches Verfahren, um diese Frage zu lösen, bestand darin, die elektrolytische Dissoziation der in Frage stehenden Säuren herabzusetzen, und da unter diesen eben die Ameisensäure, die Essigsäure und die Milchsäure, welche sehr häufig als Bakterienprodukte entstehen, diejenigen waren, die, in Betracht eventueller Anwendungen dieser Studien auf die Pathogenese der Infektionen, mir das größte Interesse darzubieten scheinen, genügte es zu meinem Zwecke, daß ich ihre alkalischen Salze zusetzte. Die Versuche wurden sowohl mit der im Anfang gegenwärtiger Arbeit angegebenen Methode wie durch Anlegung von Plattenkulturen ausgeführt, wobei im ersten Fall Sporen, im zweiten seit wenigen Stunden entstandene Bacillen benutzt wurden. In der Tabelle V und VI habe ich die Resultate zweier solcher Versuche dargestellt. Dieselben können als Beispiele dienen.

Tabelle V.

Die Säuren wurden in  $n/_{10}$ , die Salze in N-Lösung benutzt. Zur Saat wurden Sporen benutzt.

Eislerum	Entwicklung
0,8 ccm + 0,2 ccm Wasser	— nach 6 Tagen
0,8 „ + 0,1 „ Ameisensäure + 0,1 ccm Wasser	spärlich nach 18 Stunden
0,8 „ + 0,1 „ „ + 0,1 „ Ameisensaures Kali	18
0,8 „ + 0,1 „ „ + 0,1 „ Natron	sehr spärlich nach 18 Std.
0,8 „ + 0,1 „ Essigsäure + 0,1 „ Wasser	spärlich nach 18 Stunden
0,8 „ + 0,1 „ „ + 0,1 „ Essigsaures Kali	Spuren nach 18 Stunden
0,8 „ + 0,1 „ „ + 0,1 „ Natron	sehr spärlich nach 18 Std.
0,8 „ + 0,1 „ Milchsäure + 0,1 „ Wasser	spärlich nach 18 Stunden
0,8 „ + 0,1 „ „ + 0,1 „ milchsaures Kali	sehr spärlich nach 18 Std.
0,8 „ + 0,1 „ „ + 0,1 „ Natron	18
0,8 „ + 0,1 „ Ameisensaures Kali + 0,1 „ Wasser	minimale Spuren n. 24 Std.
0,8 „ + 0,1 „ „ Natr. + 0,1 „ „	Spuren nach 24 Stunden
0,8 „ + 0,1 „ Essigsaures Kali + 0,1 „ „	18
0,8 „ + 0,1 „ „ Natron + 0,1 „ „	sehr spärlich nach 24 Std.
0,8 „ + 0,1 „ milchsaures Kali + 0,1 „ „	Spuren nach 42 Stunden
0,8 „ + 0,1 „ „ Natr. + 0,1 „ „	„ „ 18 „

Tabelle VI.

Die Säuren werden in  $n/_{10}$ , die Salze in N-Lösung benutzt, Besäung mit 1060 Bacillen.

Eislerum	Zahl der Kolonien nach 3 Std. bei 37°
0,8 ccm + 0,2 ccm Wasser	49
0,8 „ + 0,1 „ Ameisensäure + 0,1 ccm Wasser	3500
0,8 „ + 0,1 „ „ + 0,1 „ Ameisensaures Kali	2150
0,8 „ + 0,1 „ „ + 0,1 „ Natron	2500
0,8 „ + 0,1 „ Essigsäure + 0,1 „ Wasser	4050
0,8 „ + 0,1 „ „ + 0,1 „ Essigsaures Kali	1670
0,8 „ + 0,1 „ „ + 0,1 „ Natron	3550
0,8 „ + 0,1 „ Milchsäure + 0,1 „ Wasser	4250
0,8 „ + 0,1 „ „ + 0,1 „ milchsaures Kali	3300
0,8 „ + 0,1 „ „ + 0,1 „ Natron	2300
0,8 ccm + 0,1 ccm Ameisensaures Kali + 0,1 ccm Wasser	8
0,8 „ + 0,1 „ „ Natron + 0,1 „ „	3
0,8 „ + 0,1 „ Essigsaures Kali + 0,1 „ „	250
0,8 „ + 0,1 „ „ Natron + 0,1 „ „	4
0,8 „ + 0,1 „ milchsaures Kali + 0,1 „ „	17
0,8 „ + 0,1 „ „ Natron + 0,1 „ „	15
0,8 ccm + 0,1 ccm Oxalsäure + 0,1 „ Wasser	1000
0,8 „ + 0,1 „ Salzsäure + 0,1 „ „	2700

Aus diesen beiden Tabellen ergibt sich:

- 1) daß der Zusatz des Ameisensauren, des Essigsauren und des milchsauren Kalis resp. Natrons zu den Lösungen der entsprechenden Säuren eine, wenn auch nur geringe, offenbar mit der Herabsetzung der elektrolytischen Dissoziation zu-

sammenhängende Verminderung der Wirkung dieser Säuren auf die Sera bewirkt;

2) daß die genannten Salze (und zwar auch das Kaliumacetat, welches sich in anderen Fällen ähnlich wie das Natriumacetat verhielt), allein zugesetzt, das bakterizide Vermögen des Serums etwas zu erhöhen scheinen, daß aber diese Erhöhung, wenn sie wirklich eintritt, eine vorübergehende ist und von einer Herabsetzung der bakteriziden Wirkung des Serums gefolgt wird. Dies geht aus der Tabelle V deutlich hervor, aus welcher wir ersehen können, daß in den Seris mit Zusatz von Salzen die Entwicklung zwar später als in den säurehaltigen Seris, aber viel früher als im normalen Serum beginnt.

Da die alkalischen Salze der organischen Säuren die Eigenschaft besitzen, sich zu hydrolysieren, liegt die Annahme nahe, daß die soeben erwähnte Erscheinung mit der Konzentration des OH' in den diese Salze enthaltenden Seris zusammenhängt und daß infolgedessen eine ähnliche aber intensivere Erscheinung bei den echten Alkalien eintritt. Zu diesem Zwecke führte ich wiederholte Versuche mit Aetzkali und auch mit Ammoniak aus, welches letztere ein häufig vorkommendes Produkt des Bakterienmetabolismus ist und stellte einen Vergleich zwischen der Wirkung dieser Körper mit derjenigen der Säuren, unter Anwendung derselben Konzentration und eines und desselben Serums an.

Diese Untersuchungen haben gezeigt, daß tatsächlich auch die Basen imstande sind, das bakterizide Vermögen der Sera abzuschwächen, jedoch nicht in demselben Maße wie die Säuren (wie aus dem in Tabelle VII dargestellten Beispiel deutlich

Tabelle VII.

Die Säuren und die Basen wurden in  $n/_{10}$ -Lösung angewendet.

Eselsersum	Zugesetzte Lösung					
0,8 ccm + 0,2 ccm Wasser			spärliche	Entwicklung nach	7 Tagen	
0,8 " + 0,05 " $\text{NH}_3$	Die Mischung wird durch Zusatz von Wasser auf ein Volumen von 1 ccm gebracht		"	"	4	"
0,8 " + 0,1 " "			Spuren von	"	4	"
0,8 " + 0,2 " "			"	"	4	"
0,8 " + 0,05 " $\text{KOH}$			spärliche	"	7	"
0,8 " + 0,1 " "			Spuren von	"	3	"
0,8 " + 0,2 " "			ganz spärliche	"	48 Std.	
0,8 " + 0,05 " Milchsäure			ziemlich reichliche	"	18	"
0,8 " + 0,1 " "			reichliche	"	18	"
0,8 " + 0,2 " "			ziemlich reichliche	"	18	"

hervorgeht). Dagegen konnte ich keinen konstanten noch deutlichen Unterschied zwischen dem KOH und dem  $\text{NH}_3$  nachweisen. Nur in einzelnen Fällen, so z. B. bei dem in Tabelle VII dargelegten Versuch, entfaltete das KOH eine stärkere Wirkung als das  $\text{NH}_3$ .

Eine weitere Frage, mit welcher sich übrigens bereits Lingelsheim, wenn auch nicht eingehend befaßt hat, und welche verdient, untersucht zu werden, war die, ob es möglich sei, die Wirkung der Säuren auf die Sera durch den Zusatz geeigneter Mengen von Alkalien zu unterdrücken. Die soeben erwähnte Beobachtung bezüglich des Einflusses alkalischer Salze organischer Säuren auf diese Säuren, genügte zwar, indem sie den Einfluß der Konzentration der  $\text{H}^+$  auf die aktiven Sera zeigte, schon, um annehmen zu dürfen, daß die Neutralisierung der angesäuerten Sera das bakterizide Vermögen dieser wieder herstelle; es fehlte aber noch der Nachweis davon, wie weit diese Wiederherstellung eintritt.

Zu diesem Zwecke führte ich folgende Versuche aus. Ich bereitete eine Reihe von Glasröhrchen mit je 0,8 ccm frischen Serums und Zusatz von 0,1 ccm  $\text{n}/_{10}$ -Milchsäure, und eine weitere Reihe von Röhrchen mit derselben Serummengenge + 0,1 ccm Wasser. Dann setzte ich mit verschiedenen Zeitabständen einem Röhrchen der ersten Reihe 0,1 ccm von  $\text{n}/_{10}$ -KOH und einem Röhrchen der zweiten Reihe 0,1 ccm Wasser zu und säte in die beiden Röhrchen eine und dieselbe Menge (1 Normalöse) einer wässerigen Aufschwemmung von alten Sporen. Da ich nicht bei allen Versuchen dieselbe Aufschwemmung benutzen konnte, weil die Versuche zu lange dauerten, stellte ich jedesmal eine frische Aufschwemmung einer und derselben Kultur her und sorgte dafür, möglichst immer die gleiche Konzentration der Emulsion zu erhalten.

In Tabelle VIII habe ich einige dieser Versuche dargestellt, welche ich hauptsächlich mit Kaninchenserum ausführte. Aus denselben geht hervor, daß die durch die Milchsäure — und dasselbe gilt für die Salzsäure — bewirkte Modifizierung der Sera durch die Neutralisierung mit KOH nicht ganz kompensiert resp. unterdrückt werden kann. Wenn man die Unregelmäßigkeiten, welche die Resultate hier und da aufweisen, und die Fehler in Betracht zieht, welche bei

Tabelle VIII.

24 Stunden altes Kaninchenserum. Bei den Versuchen No. 1—4 geschah die Infektion 45 Minuten nach der Neutralisierung der mit 10 Proz. von  $n/_{10}$ -Milchsäure angesäuerten Sera durch  $n/_{10}$ -NOH; bei den Versuchen a—f wurden die Sera hingegen 30 Minuten nach der Neutralisierung infiziert.

	Neutralisierung mit KOH nach	Entwicklung	Nach
Probe No. 1	45 Minuten	spärlich	3 Tagen
Kontrolle zu No. 1	—	—	4
Probe No. 2	5 Stunden	ziemlich stark	63 Stunden
Kontrolle zu No. 2	—	spärlich	3 Tagen
Probe No. 3	24 Stunden	„	63 Stunden
Kontrolle zu No. 3	—	„	24
Probe No. 4	48 Stunden	sehr spärlich	3 Tagen
Kontrolle zu No. 4	—	spärlich	24 Stunden
Probe a	30 Minuten	sehr reichlich	4 Tagen
Kontrolle zu a	—	ziemlich reichlich	5
Probe b	7 Stunden	spärlich	5
Kontrolle zu b	—	—	4
Probe c	24 Stunden	sehr spärlich	24 Stunden
Kontrolle zu c	—	„	48
Probe d	48 Stunden	reichlich	48
Kontrolle zu d	—	spärlich	48
Probe e	77 Stunden	reichlich	24
Kontrolle zu e	—	spärlich	24
Probe f	96 Stunden	„	18
Kontrolle zu f	—	„	18

Anmerkung: Beide Sera zeigten, selbst frisch, angesäuert und dann in derselben Weise infiziert, wie die verschiedenen Proben der Tabelle, bereits nach 18 Stunden eine sehr reichliche Entwicklung.

der Anwendung von selbst mit der größten Sorgfalt hergestellten titrierten Lösungen leicht vorkommen können, so muß man meiner Ansicht nach zugeben, daß man aus diesen Versuchen nur die übrigens wichtige Schlußfolgerung ziehen kann, daß Sera, welche selbst während mehreren Stunden der Wirkung der Säuren ausgesetzt wurden, infolge der Neutralisierung der Säure mit einer Basis ihr bakterizides Vermögen, wenigstens zum Teil, wieder annehmen.

## IV.

Zur Untersuchung der Wirkung der Säuren und Basen habe ich auch andere Keimarten, d. h. den *Choleravibrio* und den *Typhusbacillus* benutzt.

Tabelle IX.

0,8 ccm Eselserum. Alle Proben werden durch Zusatz von Wasser auf 1 ccm gebracht. Die Reagentien werden in  $n/_{10}$ -Lösung angewendet.

	Milzbrandsporen		Cholera vibrio		Typhusbacillen	
	Entwicklung					
Serum	spärlich	n. 7 Tag.	spurenweise	n. 3 Tag.	spärlich	n. 18 Std.
	mittelmäßig	„ 9 „	sehr reichl.	„ 4 „	„	„ 4 Tag.
„ + 0,05 ccm NH <sub>3</sub>	spärlich	„ 4 „	spurenweise	„ 2 „	sehr spärlich	„ 18 Std.
	sehr reichl.	„ 8 „	sehr reichl.	„ 4 „	reichlich	„ 4 Tag.
„ + 0,1 „	spurenweise	„ 4 „	spurenweise	„ 40 Std.	spurenweise	„ 18 Std.
	reichlich	„ 8 „	sehr reichl.	„ 4 Tag.	reichlich	„ 4 Tag.
„ + 0,2 „	spurenweise	„ 4 „	mittelmäßig	„ 1 „	mittelmäßig	„ 40 Std.
	reichlich	„ 8 „	sehr reichl.	„ 4 „	reichlich	„ 4 Tag.
„ + 0,05 „ KOH	spärlich	„ 7 „	spurenweise	„ 2 „	sehr spärlich	„ 18 Std.
	mittelmäßig	„ 9 „	sehr reichl.	„ 4 „	mittelmäßig	„ 4 Tag.
„ + 0,1 „	spurenweise	„ 3 „	spärlich	„ 2 „	spärlich	„ 40 Std.
	mittelmäßig	„ 4 „	sehr reichl.	„ 4 „	mittelmäßig	„ 4 Tag.
„ + 0,2 „	sehr spärlich	„ 2 „	spärlich	„ 18 Std.	keine	„ 9 „
	mittelmäßig	„ 4 „	sehr reichl.	„ 4 Tag.		
„ + 0,05 „ Milchsäure	„	„ 18 Std.	spärlich	„ 4 „	mittelmäßig	„ 18 Std.
	reichlich	„ 4 Tag.	reichlich	„ 8 „	reichlich	„ 4 Tag.
„ + 0,1 „	„	„ 18 Std.	spurenweise	„ 3 „	mittelmäßig	„ 18 Std.
	sehr reichl.	„ 4 Tag.	reichlich	„ 8 „	sehr reichl.	„ 4 Tag.
„ + 0,2 „	reichlich	„ 18 Std.	sehr spärlich	„ 40 Std.	mittelmäßig	„ 18 Std.
	sehr reichl.	„ 4 Tag.	„	„ 8 Tag.	sehr reichl.	„ 4 Tag.

Tabelle X.

0,8 ccm frisches Kaninchenserum. Alle Proben werden durch Zusatz von Wasser auf 1 ccm gebracht. Die Reagentien werden in  $n/_{10}$ -Lösung benutzt.

		Cholravibrien	Typhusbacillen		
		Entwicklung			
Serum		nach 9 Tag.	keine	nach 18 Std.	mikrosk. Spuren
„ + 0,1 ccm NH <sub>3</sub>		„ 4 „	reichl.	„ 24 „	mittelmäßige
„ + 0,2 „	„	„ 40 Std.	„	„ 18 „	„
„ + 0,1 „ KOH		„ 9 Tag.	keine	„ 9 Tag.	keine
„ + 0,2 „	„	„ 4 „	reichl.	„ 9 „	„
„ + 0,1 „ Milchsäure		„ 9 „	keine	„ 18 Std.	sehr reichliche
„ + 0,2 „	„	„ 9 „	„	„ 18 „	reichliche

Ich habe zwei Beispiele dieser Experimente in den Tabellen IX und X dargestellt. Die interessanteste Beobachtung, die ich bei diesen Versuchen machte, war die, daß das Ammoniak, das Aetzkali und die Milchsäure die bakteriziden Sera, ebenso wie gegen die Milzbrandbacillen,

auch gegen die Cholera-vibrionen und Typhusbacillen inaktivieren, daß aber die drei Reagentien in gleicher Konzentration bei einem und demselben Serum nicht dieselbe inaktivierende Wirkung ausüben, und daß ebenfalls diese gegenüber den drei Keimarten eine verschiedene ist. Die Milchsäure, welche den besten Inaktivator — sowohl des Kaninchen- wie des Eselserums — gegenüber dem Milzbrandbacillus und dem Typhusbacillus darstellt, inaktiviert die genannten Sera in viel geringerem Grade gegenüber dem Cholera-vibrio, für welchen hingegen die Alkalien, und namentlich das Ammoniak, ein ausgezeichnetes Inaktivierungsmittel darstellen. Hierbei ist das Resultat zwei verschiedener Erscheinungen zu unterscheiden, nämlich einerseits der Wirkung jeder Substanzen auf das sogenannte bakterizide Vermögen der Sera, und andererseits des Einflusses einer stärkeren Konzentration der im Serum enthaltenen Säuren oder Alkalien auf die Lebensfunktionen der verschiedenen Bakterien.

Einen sicheren Beweis dafür stellt beispielsweise das Verhalten des Cholera-vibrios dar, der imstande ist, sich in Substraten zu entwickeln, die eine derartige Menge Alkali enthalten, wie sie von vielen anderen Keimen schwerlich vertragen wird, während er äußerst empfindlich gegen die Säuren ist, und welcher hier gerade im Ammoniak und im Aetzkali Inaktivatoren der Sera findet, die der Milchsäure sehr überlegen sind.

## V.

Die zahlreichen Beobachtungen über die Wirkung der Säuren und Basen auf die hämolytischen Sera, welche besonders während der letzten Jahre gesammelt wurden, veranlaßten mich zur Untersuchung, ob auch im Falle der bakteriziden Sera diese Wirkung auf das Komplement und auf die spezifischen Ambozeptoren ausgeübt wird.

Die ersten Versuche in dieser Richtung führte ich mit Eselserum, Milzbrandbacillen und -sporen aus. Bei demselben untersuchte ich zuerst, ob der Zusatz von Kaninchenfibrin-extrakt — welcher erwärmtes Serum reaktiviert — imstande war, das bakterizide Vermögen der Gemische von Serum und Säuren oder von Serum und Basen wieder herzustellen. Diese



Versuche sind mir mit den Milzbrandbacillen besser als mit den Sporen, und mit den Säuren (Ameisensäure) besser als mit den Basen gelungen und haben gezeigt, daß tatsächlich der Zusatz einer geringen Menge eines wässerigen Fibrin-extraktes zu den Mischungen von Serum und Säuren eine, zuweilen bedeutende Verzögerung der Entwicklung der in jene Gemische gesäten Bacillen bewirkte.

Ich entschloß mich jedoch sehr bald dazu, zu diesen Untersuchungen den Choleravibrio zu benutzen, mit welchem man die bakterizide Wirkung viel genauer bestimmen kann, dank der besonderen morphologischen Veränderungen, die dieser Keim während der Bakteriolyse erfährt und welche in vitro und in vivo zu untersuchen ich mir vornahm, in vivo besonders um den Einfluß zu ermitteln, den die Säuren und Basen auf die Sensibilisierung der Bakterien ausüben. Diesen zweiten Teil meines Planes mußte ich jedoch aus Gründen, die ich kurz anführen werde, recht bald verlassen.

Um recht deutliche Resultate zu erzielen, benutzte ich von den gegen Choleravibrio immunisierten Kaninchen gelieferte Sera, deren bakteriolytischer Titer zwischen 0,0005 und 0,001 schwankte. Um zu untersuchen, wie die Sensibilisierung in Gegenwart von Säuren oder Alkalien — zu diesem Zwecke benutzte ich Milchsäure und Ammoniak — vor sich ging, wendete ich das Serum zuerst stark verdünnt an, mußte mich aber überzeugen, daß man aus der Tatsache, daß das Pfeiffersche Phänomen sowohl bei den mit reinem Serum behandelten Vibrionen, wie bei denen vollständig eintrat, die mit Serum + 20 Proz. der  $\frac{1}{10}$  n-Säurelösung oder der Basis behandelt wurden, keineswegs schließen kann, daß die betreffende Säure resp. Basis keinen Einfluß auf die Sensibilisierung ausüben. Die sehr verdünnten Serumlösungen mit Zusatz jener Mengen von Reagentien, und besonders von Milchsäure, sind nämlich schon an und für sich, unabhängig von irgendwelcher spezifischer Wirkung, schädlich für die Vibrionen, so daß die Pfeiffersche Probe, indem sie mit Bakterien ausgeführt wurde, deren Lebensfähigkeit bereits, je nach der Behandlung, der sie unterzogen wurden, verschieden modifiziert wurde, in unserem Falle den größten Teil ihrer Bedeutung einbüßte.

Ich verdünnte deshalb das bakteriolytische Serum nicht mit physiologischer Kochsalzlösung, sondern mit einem anderen normalen, ebenfalls inaktivierten Serum; alle normalen Sera, über die wir gewöhnlich verfügen können, enthalten aber eine gewisse Menge von Ambozeptoren für den Choleravibrio. Die Folge dieser Sachlage war, daß die Pfeiffersche Probe auch bei den Vibrionen positiv ausfiel, die ich zu Kontrollzwecken, mit reinem normalen Serum, mit oder ohne Zusatz von Säure oder Basis emulgiert hatte.

Es blieb mir nur noch ein Weg übrig: wenig verdünnte Lösungen von bakteriolytischem Serum anzuwenden. Ich benutzte deshalb 0,1—0,3 ccm Serum — welche durch Zusatz von physiologischer Kochsalzlösung auf 1 ccm gebracht wurden — für jede Oese der Choleravibrionenagarkultur. Unter diesen Verhältnissen erhielt ich nach 1 Stunde bei 37° C mit den gut gewaschenen Vibrionen das Pfeiffersche Phänomen sowohl in An- wie in Abwesenheit von Milchsäure und Ammoniak.

Auch dieses Resultat schien mir jedoch nicht einwandfrei. In der Tat, angenommen, daß 1 ccm der Flüssigkeit auch nur 0,01 bakteriolytischen Serums, 0,2 ccm Milchsäure oder Ammoniak ( $\frac{1}{10}$ -n) und 1 Oese Choleravibrionen enthält; wenn wir nach erfolgter Sensibilisierung zentrifugieren und sorgfältig den flüssigen Teil entfernen, wird auf dem Boden des Röhrchens die Masse der Vibrionen zurückbleiben, befeuchtet mit einer gewissen Menge, z. B. 0,1 ccm der Serumverdünnung. Wenn wir nun, zwecks Waschung, z. B. 4,9 ccm physiologischer Kochsalzlösung zusetzen, erhalten wir eine Verdünnung des Serums = 1:500 und eine Lösung von Milchsäure resp. Ammoniak =  $\frac{1}{2500}$ -n, so daß infolge dieser ersten Waschung die Wirkung der Säure beseitigt wird, während diejenige des Serums nicht unterdrückt wird und somit das Serum, wenn dies nicht bereits geschehen, die Vibrionen während der Zwischenzeit vor der ersten zur zweiten Waschung wenigstens zum Teil sensibilisieren kann.

Um diesen Uebelstand zu beseitigen, führte ich die erste und zweite Waschung mit einer physiologischen Kochsalzlösung aus, welcher ich eine solche Menge Milchsäure resp.

Ammoniak zusetzte, daß der Lösung annähernd dieselbe Azidität resp. Alkaleszenz, wie diejenige der ursprünglichen Mischung: Serum + Säure resp. Serum + Ammoniak, verliehen wurde. Hierdurch entstand aber ein neuer Uebelstand, indem die Waschung mit solchen Lösungen die Vibrionen stark veränderte und somit meine Versuche wertlos gestaltete.

Es ist nicht unwahrscheinlich, daß man durch Anwendung von an Ambozeptoren verhältnismäßig armen Seris manche Schwierigkeiten beseitigen kann, ich habe es aber, unter der Vermutung, daß neue Fehlerquellen in anderer Richtung entstehen würden, vorgezogen, ohne weiteres zu Versuchen in vitro meine Zuflucht zu nehmen, welche sich in meinem Fall zu einer jedenfalls exakteren Kontrolle zu eignen schienen.

Ich will nur einen dieser Versuche ausführlich beschreiben, um so mehr, als dadurch auch alle übrigen kurz zusammengefaßt werden.

Ich benutzte das während 1 Stunde auf 60° C erwärmte und auf 1:10 verdünnte Serum eines gegen den Choleravibrio immunisierten Kaninchens. Den Sensibilisierungsversuch stellte ich mit Serum und mit Serum + Ammoniak an, nahm von einem Experiment mit Milchsäure vorläufig Abstand. Die sorgfältig mit physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmten Vibrionen wurden im Verhältnis von 1 Normalöse der Kultur auf 1 ccm der Serumverdünnung in die Serumproben gebracht; die Gemische wurden 3 Stunden im Dunkeln bei Zimmertemperatur stehen gelassen, dann rasch zentrifugiert und 4mal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Um die Waschung zu erleichtern, wurden einige Granaten in die Zentrifugenglasröhrchen getan, durch welche die Vibrionen gründlich geschüttelt und die Klumpen, zu welchen die Keime sich agglutiniert hatten, getrennt werden konnten.

Zur Kontrolle wurde eine Aufschwemmung von Vibrionen hergestellt, welcher im Augenblick, wo die Zentrifugation der übrigen Gemische beginnen sollte, in demselben Verhältnisse wie bei diesen, eine Mischung von Serum und Ammoniak beigemischt wurde. Auch dieses Gemisch wurde zu gleicher Zeit mit den übrigen zentrifugiert, ebenso wie auch hier die Vibrionen gewaschen wurden. Diese befanden sich somit unter denselben Verhältnissen wie die während 3 Stunden mit Serum + Ammoniak behandelten, vorausgesetzt, daß das Ammoniak die Sensibilisierung hintangehalten hätte.

Dieser Kontrollversuch hatte somit den Zweck, festzustellen, ob die kurze Dauer der Waschung zur mehr oder minder vollständigen Sensibilisierung der Keime durch das mächtig verdünnte Serum, selbst bei Zusatz von Ammoniak genügen konnte.

Alle Röhrchen wurden zum ersten Mal mit 10 und nachher mit 7—8 ccm physiologischer Kochsalzlösung gewaschen; jedes Röhrchen enthielt 3 Normalösen von Cholerakultur.

Nach vollendeter Waschung wurde das Sediment jedes Röhrchens in einer gleichen Menge physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und dann in kleine Röhrchen mit verschiedenen Mengen reinen frischen Meerschweinchenserums oder denselben + Milchsäure oder + Ammoniak gesät. Die Gemische wurden durch Zusatz von physiologischer Kochsalzlösung auf das gleiche Volumen gebracht und in den Thermostaten gestellt. Nach 1 und nach 12 Stunden wurde im hängenden Tropfen und durch gefärbte Präparate mikroskopisch untersucht; zuweilen wurden auch kulturelle Untersuchungen ausgeführt.

Um die Wirkung des normalen Meerschweinchenserums zu kontrollieren, welches auch einen gewissen Grad von bakteriolytischem Vermögen besitzt, wurden verschiedene Mengen dieses Serums mit einer kleinen Menge einer wässrigen Aufschwemmung von Vibrionen besät, so daß mehr oder minder derselbe Reichtum an Vibrionen hergestellt wurde wie in den Gemischen von sensibilisierten Vibrionen.

Die Resultate habe ich in den Tabellen XI und XII zusammengestellt (siehe p. 23 und 24).

Wenn wir die in Tabelle XI unter No. 1 und 2 dargestellten Resultate mit denen von Tabelle XII vergleichen, so sehen wir, daß Vibrionen, welche derart sensibilisiert sind, daß sie durch gewisse Dosen frischen Meerschweinchenserums leicht getötet werden können, in diesem Serum leben und sich vermehren können, wenn demselben geeignete Mengen Ammoniak oder Milchsäure zugesetzt wurde, woraus zu schließen ist — jedoch, wie wir weiter unten sehen werden, nicht mit Sicherheit — daß die Wirkung dieser Stoffe sich direkt auf das Komplement ausübt.

Wir sehen ferner, daß das Ammoniak eine stärkere Wirkung entfaltet als die Milchsäure, indem im ersten Fall nicht nur das Pfeiffersche Phänomen fehlt, sondern eine lebhafte Vermehrung der Keime stattfinden kann. Es steht jedoch außer Zweifel, daß dieser Unterschied zwischen dem Ammoniak und der Milchsäure auf eine direkte Wirkung dieser Körper nicht nur auf die bakteriziden Stoffe der Sera, sondern auch auf die Funktionen des Bakterienprotoplasmas zurückzuführen ist, da der Choleravibrio — es sei dies hier wiederholt — in Gegenwart ziemlich großer Mengen freier Alkalien zwar vegetiert, dagegen äußerst empfindlich gegen die Säuren ist. Da-

Tabelle XI.

	Meerschw.- Serum ccm	Resultate nach 1 Stunde	Resultate nach 12 Stunden
1) Wässerige Vibri- onenaufschwem- mung	0,4	Sehr zahlreiche Gra- nula; zahlr. normale Vibrionen	Wenige Granula; sehr zahlreiche nor- male Vibrionen
dgl.	0,1	Zahlreiche Granula; zahlreiche normale Vi- brionen	dgl.
"	0,05	Mehrere Granula; sehr zahlreiche normale Vi- brionen	Zahlreiche Granula; zahlreiche normale Vibrionen
"	0,025	Außerst selten Granu- la; sehr zahlreiche nor- male Vibrionen	Zahlreiche Granula; mehrere normale Vibrionen
"	0,05 <sup>1)</sup>	Vibrionen intakt	—
2) Mit bakteriolyti- schem Ser. behan- delte Vibrionen	0,4	Sehr zahlreiche Granu- la; einzelne normale Vibrionen	Granula
dgl.	0,1	dgl.	dgl.
"	0,05	"	"
"	0,025	"	"
"	0,05 <sup>1)</sup>	Vibrionen intakt	—
3) Mit bakteriolyti- schem Serum + Ammoniak behan- delte Vibrionen	0,4	Granula	Granula und einige normale Vibrionen
dgl.	0,1	Granula und einige normale Vibrionen	Granula und zahl- reiche normale Vi- brionen
"	0,05	Granula und zahlreiche normale Vibrionen	dgl.
"	0,025	dgl.	Granula und sehr zahlreiche normale Vibrionen
"	0,05 <sup>1)</sup>	Vibrionen intakt	—
4) Die Vibrion. wur- den im Augenblick der Waschung mit bakteriolytischem Serum + Ammoni- ak gemischt	0,4	Sehr zahlreiche Granu- la; einige normale Vi- brionen	Granula
dgl.	0,1	dgl.	dgl.
"	0,05	Sehr zahlreiche Granu- la; mehrere normale Vibrionen	"
"	0,025	dgl.	Granula u. mehrere normale Vibrionen
"	0,05 <sup>1)</sup>	Vibrionen intakt	—

1) Während 1 Stunde auf 55° C erwärmtes Meerschweinchenserum.

Tabelle XII.

Die Vibrionen waren während 3 Stunden bei Zimmertemperatur mit durch die Wärme inaktiviertes bakteriolytisches Serum behandelt<sup>1)</sup>.

Meerschw.- Serum ccm	Dem Serum zuge- setzte Substanz	Resultate nach 1 Stunde	Resultate nach 12 Stunden
1) 0,4	0,05 ccm einer n/10- Lösung von NH <sub>3</sub>	Sehr zahlreiche Granu- la; mehrere normale Vibrionen	Keine Granula; die Vibrionen haben sich augenschein- lich vermehrt
0,1	dgl.	Außerst selt. Granula	dgl.
0,05	"	Keine Granula. Vibri- onen intakt	"
0,025	"	dgl.	"
2) 0,4	0,1 ccm einer n/10- Lösung von NH <sub>3</sub>	Wenige Granula; sehr zahlreiche normale Vi- brionen	"
0,1	dgl.	Keine Granula. Vibri- onen intakt	"
0,05	"	dgl.	"
0,024	"	"	"
3) 0,4	0,05 ccm einer n/10- Lös. v. Milchsäure	Granula	Granula
0,1	dgl.	Mehrere Granula; sehr zahlreiche normale Vi- brionen	Zahlreiche Vibrion.
0,05	"	Vibrionen intakt	dgl.
0,025	"	dgl.	Sehr zahlreiche Vi- brionen
4) 0,4	0,1 ccm einer n/10- Lös. v. Milchsäure	Granula	Wenige Granula
0,025	dgl.	Vibrionen intakt	Sehr zahlreiche Vi- brionen

Alle Gemische der Tabellen XI und XII wurden durch Zusatz von physiologischer Kochsalzlösung auf 0,5 ccm gebracht: das Ammoniak resp. die Milchsäure wurde nach dem Zusatz der physiologischen NaCl-Lösung zugesetzt.

durch erklärt sich auch die Tatsache, daß die sensibilisierten Vibrionen, wenn sie in Mischungen von Meerschweinchenserum und Milchsäure getan werden, trotzdem sie der Bakteriolyse entgehen, jedoch ziemlich rasch sterben, besonders wenn das Meerschweinchenserum, welches aus verschiedenen Gründen

1) Siehe in Tabelle XI No. 2 die Resultate bei Abwesenheit von Ammoniak und von Milchsäure.

den schädlichen Einfluß der Säuren hindert, in sehr spärlicher Menge vorhanden ist. So sterben bei einigen meiner Versuche die Vibrionen in Gemischen, die pro 1 ccm 0,025 ccm und zuweilen auch etwas mehr Meerschweinchenserum und 0,1—0,2 ccm  $n_{10}$ -Milchsäure enthielten, im Laufe von 2 bis 3 Tagen und nicht selten sogar früher.

Wenn man nun die Tabelle XI durchsichtigt, so sieht man ferner, daß die Anwesenheit einer gewissen Menge Ammoniak wirklich imstande ist, die Bindung der Ambozeptoren hintanzuhalten. Ein Vergleich zwischen No. 2 und 3 in dieser Tabelle läßt in der Tat keinen Zweifel bestehen, sowohl wenn man die 1 Stunde nach dem Zusatz des Komplementes erkennbaren, wie wenn man die Resultate beobachtet, die mehrere Stunden später zutage treten.

Ein noch sicheres und exakteres Urteil wird man gewinnen, wenn man das in Tabelle XI unter No. 4 angeführte Experiment in Betracht zieht, welches den Zweck hatte, zu zeigen, welche Wirkung die Waschung von vorher in einem Gemisch von Serum + Ammoniak liegenden Vibrionen haben kann, wenn diese Waschung notwendigerweise viel rascher und leichter die Wirkung des Ammoniaks als diejenige des Serums beseitigt. Wir sehen hier eben, daß die Vibrionen sich sowohl nach 1-stündigem wie nach 12-stündigem Kontakt mit dem Meerschweinchenserum anders verhalten, als diejenigen, die keinerlei Behandlung unterzogen wurden (vgl. No. 1).

Aber noch weiteres. Die durch Serum und Ammoniak sensibilisierten und dann in Meerschweinchenserum gebrachten Vibrionen erleiden nach 1 Stunde eine teilweise Bakteriolyse, auf welche eine schwache Vermehrung der überlebenden Vibrionen folgt, wie man aus der nach 12 Stunden erkennbaren Zunahme der Zahl der normalen Vibrionen leicht konstatieren kann; die Vibrionen, welche während kurzer Zeit mit derselben Menge von Serum + Ammoniak behandelt und dann sofort wiederholten Waschungen unterzogen wurden, zeigen hingegen bereits nach 1-stündigem und namentlich nach 12-stündigem Verweilen im Meerschweinchenserum eine viel ausgesprochenere Bakteriolyse als diejenige des vorigen Falles.

Die Erklärung dieser Tatsachen ist offenbar in folgenden Betrachtungen zu suchen:

1. Wenn man eine soeben hergestellte Mischung von Vibrionen, Serum und Ammoniak zentrifugiert und dann sofort das Sediment ausgiebigen Waschungen unterzieht, so geschieht es, daß die Vibrionen während einer gewissen Zeit der allmählich schwächer werdenden, jedoch wenigstens anfangs nicht zu vernachlässigenden spezifischen Wirkung des bakteriolytischen Serums ausgesetzt sind, während andererseits das Serum selbst keine oder höchstens eine ganz geringe Modifizierung infolge der Wirkung des Ammoniaks erfahren kann, weil dieses im Gemisch nur ganz kurze Zeit in der nötigen Konzentration vorhanden ist. Daraus ergibt sich die in Tabelle XI unter No. 4 angeführte Erscheinung, d. h. eine deutliche Sensibilisierung der Vibrionen, welche jedoch natürlich viel schwächer als diejenige ist, die man durch die länger dauernde Einwirkung des Serums erzielt, wie es bei No. 2 geschieht.

2. Wenn wir vernunftgemäß annehmen, daß die längere Zeit fortgesetzte Behandlung der bakteriolytischen Sera mit einer passenden Menge Ammoniak nicht nur eine Aenderung der Reaktion (im Sinne einer Alkalisierung), sondern auch, wenigstens infolge der chemischen Phänomene, die sich zwischen den Proteinen und dem Alkali abspielten, tiefer gehende Modifizierungen der Sera bewirkt, so müssen wir daraus folgern, daß, wenn wir Vibrionen, die während mehreren Stunden in Berührung mit Serum + Ammoniak gewesen sind, zentrifugieren und wiederholt waschen, die Vibrionen der Wirkung von immer schwächeren Lösungen eines Serums ausgesetzt sein werden, welches nicht mehr das einfache bakteriolytische Serum ist. In demselben sind mehr oder minder ausgesprochene Spuren der Behandlung mit Ammoniak, d. h. mit einem Körper zurückgeblieben, welcher, wie schon aus einem einfachen Vergleich zwischen No. 2 und 3 hervorgeht, die Sensibilisierung der Vibrionen stört. Die Vibrionen sind also während der Waschungen der Einwirkung von Lösungen eines Serums ausgesetzt, welches nicht das einfache aktive Serum und auch nicht das durch die Anwesenheit des Ammoniaks inaktivierte Serum ist, sondern ein Zwischenstadium darstellt,



so daß, obwohl das Ammoniak, solange es in einer gewissen Konzentration vorhanden ist, imstande ist, die Sensibilisierung vollständig zu hemmen, in diesem Falle jedoch das Pfeiffersche Phänomen eintreten muß und auch tatsächlich eintritt, aber nur teilweise und weniger angesprochen eintritt, als unter den mehrmals erwähnten Verhältnissen des Versuches No. 4.

Auf diesem Wege erklärt man, wie gesagt, alle verschiedenen bei meinen Versuchen beobachteten Erscheinungen, welche beweisen, daß die Anwesenheit von Ammoniak die Sensibilisierung der Vibrionen hemmt, und zwar ohne Zweifel in einem höheren Maße als man aus der Pfeifferschen Reaktion *in vitro* schließen würde, wenn diese nicht durch besondere Kontrollproben ergänzt wird.

## VI.

Aus den bisher berichteten Untersuchungen ergibt sich in deutlichster Weise die inaktivierende Wirkung, welche die Säuren und die Basen auf die bakteriziden Eigenschaften des Serums ausüben und welche zuweilen durch die Toxizität dieser Substanzen für verschiedene Keimarten verschleiert werden kann, wie wir bei den Säuren gegenüber dem Choleravibrio und bei den Basen gegenüber dem Typhusbacillus geschehen sehen, und wie auch schon aus den Versuchen Hegelers und Werbitzkis über die Fähigkeit des Natriumkarbonats, die Bakteriolyse zu befördern, hervorzugehen schien.

Diese inaktivierende Wirkung der Säuren und Basen nimmt, innerhalb gewisser Grenzen, in dem Maße zu, wie die Konzentration dieser Reagentien zunimmt, und erreicht, wie wir sahen, gewöhnlich ihren Höhepunkt, wenn das Serum eine schwach saure Reaktion erreicht, was bei den von mir angewendeten Seris und Substanzen mit einer Konzentration von  $n/_{50}$  erreicht wird. Bemerkenswert ist nun, nicht nur daß die wenigen vor den meinigen ausgeführten Versuche bezüglich dieser Konzentration zu ähnlichen Resultaten geführt haben wie die meinigen, sondern auch daß, bezüglich des Verhaltens in Gegenwart von Säuren und von Alkalien, im Gegensatz zu der Behauptung Pirennés, kein wesentlicher Unterschied

zwischen dem bakteriziden Vermögen gegenüber dem Milzbrandbacillus und demjenigen gegenüber dem Typhusbacillus und dem Choleravibrio, d. h. zwischen zwei Formen von Tätigkeit der Sera zu beobachten ist, welche, in manchen anderen Beziehungen, ziemliche Unterschiede aufweisen.

Wenn man übrigens den allgemeinen Verlauf der Erscheinung betrachtet, so kann man wohl behaupten, daß, bezüglich des Verhaltens gegenüber der Behandlung mit Säuren und mit Basen, auch zwischen bakteriziden Seris und hämolytischen Seris eine große Aehnlichkeit besteht. Der von mir am eingehendsten untersuchte Fall des Anticholeraserums hat gezeigt, daß die Anwesenheit einer Basis imstande ist, die Fixierung der Ambozeptoren an die Choleravibrionen zu hemmen, gerade so wie sie bei den jüngsten Versuchen von Rondoni die Bindung der hämolytischen Ambozeptoren mit den roten Blutkörperchen hemmte.

Es wäre ohne Zweifel interessant, zu untersuchen, ob weitere Analogien zwischen den hämolytischen und den bakteriziden Seris nachweisbar sind, besonders nachdem sich das Komplement dieser letzteren, wenigstens in dem von Braun<sup>1)</sup> untersuchten Fall, als in derselben Weise zusammengesetzt wie das hämolytische Serum erwiesen hat.

Andererseits wäre es wünschenswert, daß festgestellt würde, ob die Ansäuerung und die Alkalisierung der bakteriziden Sera eine Paralysisierung der Komplemente zur Folge hat, oder ob die Wirkung, die auf diese ausgeübt zu werden scheint, nicht in Wirklichkeit nur auf die Ambozeptoren ausgeübt wird. Wir haben z. B. gesagt, daß durch Anticholeraserum sensibilisierte Vibrionen, wenn sie in Meerschweinchen-serum mit Zusatz von etwas Ammoniak oder Milchsäure gebracht werden, keine Bakteriolyse erleiden. Es handelt sich nun um die Frage, ob diese Erscheinung auf der ausgebliebenen Bindung der Komplemente mit den Ambozeptoren, oder auf irgendwelcher sonstigen Modifizierung der Komplemente selbst, oder auf einer Loslösung der Ambozeptoren von den bereits sensibilisierten Vibrionen durch die betreffende Säure oder

---

1) Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 9, 1911, p. 665.

Basis beruht, oder auf beide dieser Phänomene zurückzuführen ist. Auch die Beobachtungen, welche in dieser Richtung über die hämolytischen Sera gesammelt wurden, können in dieser Hinsicht nicht als endgültig betrachtet werden, obwohl eine gewisse direkte Einwirkung auf die Komplemente nicht mehr in Abrede gestellt werden zu können scheint.

Eine weitere interessante Frage ist die, ob ein Unterschied zwischen der Wirkung von verschiedenen Säuren und Basen besteht. Dieser Unterschied scheint nicht sehr groß sein zu können, weil bei den Versuchen, über die ich hier berichtet habe, keine deutliche Differenz zum Vorschein gekommen ist. Es würde sich jedoch lohnen, eingehendere Untersuchungen in dieser Richtung auszuführen, nachdem z. B. Liefmann und Cohn<sup>1)</sup> nachgewiesen haben, daß Salzsäure und Phosphorsäure einerseits und Natriumhydrat und Natriumkarbonat andererseits auf den Bruchteil: Globulin und den Bruchteil: Albumin des hämolytischen Komplements eine durchaus verschiedene Wirkung ausüben.

Wie dem auch sei, die bisher gesammelten und in gegenwärtiger Arbeit beschriebenen Beobachtungen zeigen, von welcher Bedeutung für das Angehen und den Verlauf einer Infektion, die mehr oder minder ausgesprochene Fähigkeit der Bakterien, die säfteinaktivierenden Substanzen vom Typus der Säuren<sup>2)</sup> und der Basen zu erzeugen — welche doch häufig vorkommende Produkte des Bakterienmetabolismus sind — oder die plötzliche Bildung dieser Substanzen im Inneren der Gewebe infolge anderer Ursachen, sein würde. Es wäre durchaus nicht ausgeschlossen, daß das Wiederaufflammen alter und fast erloschener Infektionen, das Sich-Exazerbieren anderer, das Auftreten schwerer Folgen der Traumen mit ausgedehnter Gewebsnekrose, der Einfluß gewisser Symbiosen auf den Verlauf einiger Infektionskrankheiten und zahlreiche

---

1) Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 6, 1910, p. 562.

2) Diesbezüglich sind die Beobachtungen von Gamaleia (Ann. Inst. Pasteur, 1888) und von Behring (Zeitschr. f. Hygiene, 1889) über die Erzeugung von Säuren von seiten des Milzbrandbacillus zu erwähnen. Dieselbe ist nach diesen Autoren bei virulenten Stämmen eine reichlichere als bei abgeschwächten Stämmen.

andere ähnliche Erscheinungen zuweilen mit einer Aenderung der Reaktion des Blutes und der Säfte zusammenhängen. Es sind wohl einem jeden die Beobachtungen von Fodor und von v. Riegler<sup>1)</sup> über die Modifizierungen bekannt, welche die Alkaleszenz des Blutserums der Tiere während vieler Infektionskrankheiten zeigt, und welche meistens in einer schweren raschen progressiven Abnahme bei tödlich verlaufenden Infektionen bestehen.

### Zusammenfassung.

1) Der Zusatz kleiner Mengen Milchsäure zu den Seris bewirkt eine Verminderung des bakteriziden Vermögens.

2) Die von der Milchsäure ausgeübte Wirkung besitzen auch andere anorganische und organische Säuren.

3) Auch die Basen und, wenn auch in viel geringerem Maße, einige Salze einiger organischer Säuren besitzen inaktivierende Eigenschaften, ähnlich wie die Säuren.

4) Diese inaktivierenden Eigenschaften der Säuren hängen zusammen mit der Kraft der Säuren, weil sie schwächer werden, wenn vermutlich eine Verminderung der elektrolitischen Dissoziation eingetreten ist.

5) Durch Neutralisierung kann man das bakterizide Vermögen der durch selbst mehrstündige Behandlung mit Säuren inaktivierten Sera, wenigstens zum Teil, wieder herstellen.

6) Der Einfluß, den die Basen auf das bakterizide Vermögen der Sera ausüben, ist, wenigstens im Falle des Anticholeraserums, vollständig oder zum Teil auf die Sensibilisierung der Bakterien zurückzuführen.

---

1) Centralbl. f. Bakt., Bd. 30, 1901, p. 823.

*Nachdruck verboten.*

[Aus dem Institut für spezielle Pathologie innerer Krankheiten  
der k. Universität Catania. Vorstand: Prof. M. Ascoli.]

## Ueber die giftige Wirkung von Organlipoiden.

### II. Mitteilung <sup>1)</sup>.

#### Giftigkeit methylalkoholischer Hodenextrakte.

Von

Doz. Dr. G. Izar und Dr. A. Fagioli,  
Assistenten.

(Eingegangen bei der Redaktion am 15. Januar 1912.)

In einer früheren Mitteilung wies einer von uns nach <sup>1)</sup>, daß wässrige Emulsionen methylalkoholischer oder ätherischer Pankreasextrakte infolge 1-stündigen Erwärmens auf 50° stark giftige Eigenschaften annehmen; bei derselben Gelegenheit wurde betont, daß ähnliche Resultate auch mit methylalkoholischen Extrakten anderer Organe gewonnen werden konnten. Heute berichten wir über bei der Fortführung dieser Untersuchungen mit Hodenlipoidgiften gewonnenen Erfahrungen.

Zu unseren Versuchen benutzten wir Rinder- oder Hundehodenpulver, bereitet nach der an anderer Stelle <sup>2)</sup> beschriebenen Technik. Gewogene Mengen dieses Pulvers wurden mit 5 Volumina Methylalkohol (Kahlbaum) 24 Stunden bei 50° extrahiert und währenddessen wenigstens 4mal gut durchgeschüttelt; die Aufschwemmungen wurden auf Zimmertemperatur abkühlen gelassen und durch Filter Schleicher und Schüll No. 590 filtriert; das Filtrat wird in trockenen, mit Methylalkohol gewaschenen Fläschchen mit eingeschliffenem Glasstöpsel aufbewahrt. Diese Extrakte emulsionieren sich gut mit Kochsalzlösung, sogar im Verhältnisse von 1:3—5 Volumina; nur selten begegneten wir Extrakten, welche schlechte Emulsionen bildeten; in solchen Fällen wird der Extrakt auf  $\frac{1}{3}$ — $\frac{1}{5}$  seines Volumens eingengt, indem er in breithalsigem Glasgefäße 24 Stunden im Brutschrank bei 50° gehalten, und nach Erkalten filtriert wird; dann liefert der Extrakt homogene Emulsionen, obzwar er auch seine Giftigkeit zum Teil eingebüßt hat.

1) Siehe Münchener med. Wochenschr., 1911, No. 25.

2) Berliner klin. Wochenschr., 1911, No. 39.

Die Emulsion bereitet man, indem man die gewünschte Menge Extrakt mit peinlich trockener Pipette auf den Boden eines Reagenzglases einträgt, dann die entsprechende Menge Kochsalzlösung auf einmal rasch zugießt und das verkorkte Reagenzglas wiederholt umkippt. Anfangs benutzten wir stark ( $\frac{1}{50}$ — $\frac{1}{100}$ ) verdünnte Extrakte; um die Einfuhr zu großer Flüssigkeitsmengen zu vermeiden, zogen wir weiterhin konzentrierte Emulsionen ( $\frac{1}{5}$ ) heran.

Nach Herstellung der Emulsion wird ein Teil derselben 1 Stunde auf 50° im Wasserbade erhitzt und dann auf Zimmertemperatur abkühlen gelassen, der Rest bei Zimmertemperatur sich selbst überlassen.

Während die Pankreas- und Tumorextrakte nur nach Erhitzen toxische Wirkung entfalten, besitzen die Extrakte bestimmter Organe schon an sich einen gewissen Grad von Giftigkeit, der für die einzelnen Organe verschieden ausgesprochen und von Fall zu Fall verschieden stark, mitunter bedeutend ist. Der Hoden gehört eben zu den Organen mit primärer Lipoidtoxizität und wurde gerade deshalb die nähere Untersuchung mit diesem begonnen.

Als Versuchstier wählten wir das Kaninchen, welches in den früheren Versuchen sich empfindlicher als das Meerschweinchen erwiesen hatte. Die Einverleibung der Emulsionen erfolgte intravenös.

Die Symptomatologie der mit tödlichen Mengen erhitzter Emulsionen methylalkoholischer Hodenextrakte entspricht jener von einem von uns für Pankreas- und Tumorlipode schon beschriebenen<sup>1)</sup> und weist Aehnlichkeit mit der Anaphylatoxinvergiftung sowie mit der Vergiftung durch wässrige Organextrakte auf. Das Tier bleibt zunächst einige Sekunden bis Minuten ruhig und unbeweglich, worauf es langsam die paralytisch in dieser Stellung verbleibenden Hinterfüße ausstreckt; die Atmung ist erschwert, nimmt dann den Cheyne-Stokesschen Typus an und wird darauf enorm beschleunigt, während tonisch-klonische allgemeine Krämpfe mit propulsorischen Sprüngen, Schwimmbewegungen der Vorderextremitäten, Opisthotonus und Exophthalmus auftreten. Diese Krampfperiode ist von einer paralytischen gefolgt, während welcher die Reflexe, mit Ausnahme des Cornealreflexes, erloschen sind. Das Tier öffnet das Maul und führt tiefe, öfters geräuschvolle Inspirationen aus mit längeren Pausen von Apnoë. Nun verschwindet auch der Cornealreflex und das Tier verendet. Selten tritt eine neue Krampfphase, von

1) loc. cit.

einer weiteren paralytischen gefolgt, auf. Die Tiere sterben in 1—3—5 Minuten.

Die Erscheinungen zeigen sich in der angegebenen Reihenfolge; jedoch ist die Schnelligkeit, mit welcher die einzelnen Phasen einander folgen, und ihre Dauer von Fall zu Fall sehr verschieden, so daß sie der Beobachtung, falls sie nicht geübt und ununterbrochen ist, leicht entgehen können.

Der Injektion von Multiplen der tödlichen Dosis erliegen die Tiere mitunter, aber selten, sofort, indem sie einfach tot hinfallen; öfters wird das Tier, sobald die tödliche Minimaldosis um wenigens überschritten ist, von Krämpfen befallen, welche die Nadel aus der Vene herausreißen; das Tier stürzt sich gellend nach vorn, fällt dann plötzlich auf die Seite nieder; Krämpfe, Dyspnoë, Paralyse mit Exophthalmus, Cheyne-Stokes, Tod vollenden das Bild.

Bei Einführung untertödlicher Giftmengen weichen die meisten Symptome nur an Intensität von den durch die tödliche Minimaldosis hervorgerufenen ab: es fehlen nur die Cheyne-Stokes'sche Atmung, der Exophthalmus, der Schrei. Das Tier erholt sich allmählich vom paralytischen Stadium, welches sich in der entgegengesetzten Reihenfolge seines Auftretens löst; das Tier stützt sich anfangs auf die Vorderbeine, versucht sich aufzurichten, bewegt endlich auch die hinteren Extremitäten.

Der Obduktionsbefund ist bescheiden: öfters findet man starke Hyperämie der inneren Organe, beträchtliche Erweiterung des mehrere Minuten weiterpulsierenden rechten Herzens; Blut flüssig, subpleurale Hämorrhagien; Hyperämie und Blutergüsse in der Thymusdrüse. Nicht selten fehlt aber diese oder jene der genannten Erscheinungen und das rechte Herz enthält Fibringerinnsel.

Wässrige Emulsionen methylalkoholischer Hunde- oder Rinderhodenextrakte (im Verhältnis von 1 Teil Extrakt:4 Teilen Kochsalzlösung) rufen beim Kaninchen, intravenös eingeführt, schwere, öfters akut tödliche Erscheinungen hervor. Durch 1-stündiges Erhitzen auf 50° oder 2-stündiges

**Erhitzen auf 37° besagter Emulsionen nimmt ihre Toxizität erheblich zu. Das Gift verträgt 10' Erhitzen auf 100°. (Siehe Versuchsreihe I.)**

Mitunter unterliefen uns Extrakte, welche schon an sich, ohne erhitzt zu werden, sich ganz besonders toxisch erwiesen: in solchen Fällen erhöhte das Erhitzen ihre Giftigkeit nicht. Engten wir nun solche Extrakte auf  $\frac{1}{2}$ — $\frac{1}{3}$  ihres Volumens bei 50° ein, so hatten sie nach Abkühlung ihre Giftigkeit zum guten Teil eingebüßt: 1-stündiges Erhitzen auf 50° der mit diesen eingengten Extrakten bereiteten Emulsionen bewirkte aber Zunahme ihrer Giftigkeit. Wir beabsichtigen dieses scheinbar paradoxe Verhalten näher zu analysieren, um auszuschließen, ob nicht zufällige Ueberempfindlichkeit der Versuchstiere (zu welcher Annahme wir keinen Anhaltspunkt haben) oder sonstige zufällige Umstände im Spiele sind. (Siehe Versuchsreihe II<sup>1)</sup>.)

Nicht alle Hunde- bzw. Rinderhoden besitzen die gleiche Giftigkeit<sup>2)</sup>. Außerordentlich giftig erwiesen sich Kaninchenhodenextrakte, welches Verhalten auf eine besondere Empfindlichkeit der Versuchstiere für gleichartige Hodenlipoidextrakte hinzuweisen scheint, eine Fragestellung, die durch methodische gekreuzte Versuche in Angriff genommen werden wird. (Siehe Versuchsreihe III.)

1) Nach intravenösen Injektionen von bis 10 ccm des auf  $\frac{1}{6}$  verdünnten, von uns gebrauchten Kahlbaumschen Methylalkohols, nahmen wir bei keinem unserer zahlreichen Kontrollversuche an Kaninchen toxische Wirkung wahr. Von 10—20 ccm ist die Wirkung sehr wechselnd; es gibt Kaninchen von ca. 1 kg Gewicht, welche auch 20 ccm symptomlos vertragen, während andere geringfügige und auch schwere Erscheinungen schon nach 15 ccm zeigen; nie aber riefen sogar 20 ccm den Tod unmittelbar hervor. Bezüglich unserer Versuche sei außerdem hervorgehoben, daß gerade aus den giftigen Emulsionen infolge des Erhitzens der Methylalkohol zum Teil verdampft war und daß der eigentliche Methylalkoholgehalt der Emulsionen infolge ihres Lipoidgehaltes schon bei ihrer Bereitung schwächer als  $\frac{1}{6}$  ihres jeweiligen Volumens ausfiel. Uebrigens heben wir ausdrücklich hervor, daß auch die methylalkoholfreien Extraktemulsionen (bereitet durch Verjagung des Methylalkohols und Verteilung des Rückstandes in Kochsalzlösung) gleichfalls toxisch sind. Bei unseren längeren Versuchsreihen, welche auch quantitatives Arbeiten erforderten, vereinfachte der Gebrauch der methylalkoholischen Extraktlösungen, anstatt ihres Rückstandes die Technik wesentlich.

2) Beim Hunde konnten wir uns nicht überzeugen, daß bei sofortiger Verarbeitung der Hoden nach dem Tode die Giftigkeit der Extrakte bedeutender war.



Bei vorheriger Injektion hypertonischer Kochsalzlösungen (+ 1 Proz.  $\text{CaCl}_2$ ) vertragen die Tiere meistens eine unmittelbar darauffolgende tödliche Minimaldosis oder tritt der Tod verspätet ein. (Siehe Versuchsreihe IV.)

Die intravenöse Einführung (erhitzter sowie nicht erhitzter) wässriger Emulsionen methylalkoholischer Extrakte, bedingt Abnahme des Komplementgehaltes des Blutserums; diese Abnahme ist mitunter bei den Tieren, welche eingehen oder schwere Symptome aufweisen, besonders ausgesprochen. (Siehe Versuchsreihe V.)

In verschiedenen Versuchsreihen prüften wir ferner, ob der Zusatz homo- oder heterologen Blutserums (sowohl vor als nach dem Erhitzen der Emulsionen) die Giftigkeit letzterer beeinflusst. Es gelang uns bisher nicht, eine solche Wirkung des Blutserums zu erweisen. (Siehe Versuchsreihe VI.)

Ebensowenig glückte es uns, durch vorausgehende wiederholte Einspritzung subletaler Giftdosen, den Tieren vor der Wirkung kurz (bis 1 Stunde) darauffolgender tödlicher Mengen Schutz zu verleihen. (Siehe Versuchsreihe VII.)

Hingegen vertrug, allerdings nur eine geringe Anzahl mit subletalen Giftdosen vorbehandelter Tiere, besonders wenn sie schwere Symptome gezeigt hatten, nach 1—2—7 Tagen anstandslos die Reinjektion einer und sogar zwei tödlicher Minimaldosen. (Siehe Versuchsreihe VIII.)

Ob diese unkonstante erhöhte Resistenz, welche auch bei mit nicht erhitzten Extrakten vorbehandelten Tieren sich einstellen kann, längert andauert, konnte aus dem Grunde nicht eruirt werden, weil auch die in ihrem unmittelbaren Erfolge untertödlichen Giftmengen<sup>1)</sup> in längerem Zeitraume (8—9 Tagen) den Tod der Versuchstiere herbeiführen<sup>2)</sup>.

---

1) Und zwar auch methylalkoholfreie (s. oben Anmerkung).

2) Die vorliegenden Ergebnisse stützen sich auf ein viel reicheres Tiermaterial, als auch aus den folgenden Protokollen hervorgeht. Der Kürze halber bringen wir nur einen Teil derselben und unterlassen die Versuchsreihen, welche die beschriebenen lediglich bestätigen.

## Protokolle.

## Versuchsreihe I.

Kaninchen No.	Gewicht in g	Methylalkoholischer Extrakt	lv. eingespr. Emuls. v. 1 Teil methylalk. Extr. i. 4 Teilen 0,85-proz. NaCl-Lösung	Bemerkungen	Resultat
9	900	Hundehoden-Extrakt No. 1	5 ccm		Keinerlei Symptome
36	800		3,5 "		dgl.
2	920		5 "	Emuls. 1 <sup>h</sup> a. 50° erhitzt	† 5'
12	900		4 "	dgl.	† 50"
6	890		3,5 "	"	Keinerlei Symptome
37	830	Hundehoden-Extrakt No. 3	4 "	"	† 1'
39	1000		5 "	"	† 3'
82	1300		10 "		Keinerlei Symptome
73	1015		15 "		dgl.
78	1040		15 "		Leichte Krämpfe
80	1230	Hundehoden-Extrakt No. 2	11 "		Keinerlei Symptome
66	1230		5 "	Emuls. 1 <sup>h</sup> a. 50° erhitzt	† 3'
75	1250		4 "	dgl.	† 4'
65 A	1060		13 "		Keinerlei Symptome
60 A	1110		10 "	Emuls. 1 <sup>h</sup> a. 50° erhitzt	† 30"
62 A	1170	Rinderhod.-Extrakt No. 3	8 "	dgl.	† 20"
64 A	890		6 "	"	† 20"
63 A	940		4 "	"	† 15"
66 A	930		3 "	"	Starke Krämpfe, erh. sich
3 B	1240		10 "		Keinerlei Symptome
2 B	1100	Rinderhod.-Extrakt No. 7	5 "		dgl.
1 B	1020		5 "	Emuls. 1 <sup>h</sup> a. 50° erhitzt	† 3'
4 B	1350		3,5 "	dgl.	† 4'
13	685		15 "		Keinerlei Symptome
14	755		10 "	Emuls. 1 <sup>h</sup> a. 50° erhitzt	† 15"
15	530	R.-Ex. No. 1	7 "	dgl.	† 2"
17	1070		12 "	"	† 1'
18	990		11 "	"	† 4'
40	970		15,5 "		Keinerlei Symptome
41	960		12 "	Emuls. 1 <sup>h</sup> a. 50° erhitzt	† 2'
38	1080	R.-Ex. No. 9	10 "		Keinerlei Symptome
37	1070		7 "	Emuls. 1 <sup>h</sup> a. 50° erhitzt	† 15"
86	900		10 "	nicht erhitzt	Keinerlei Symptome
87	1000		7,5 "	Emuls. 1 <sup>h</sup> a. 50° erhitzt	† 11'
88	955		5,6 "	dgl.	Leichte Symptome
90	905	Rinderhod.-Extrakt No. 12a	6 "		† 2'
89	1360		9 "	Emuls. 2 <sup>h</sup> a. 37° erhitzt	† 1'
91	870		5,8 "	Em. 10' a. 100° erhitzt	† 50"

## Versuchsreihe II.

Kaninchen No.	Gewicht in g	Methylalkohol. Extrakt aus Rinderhoden  No.	Iv. eingespr. Emuls. v. 1 Teil methylalk. Extr. + 1 Teil 0,85- proz. NaCl-Lösung	Bemerkungen	Resultat
99	890	6	4,5 ccm		+ 2'
100	910	6	4,5 "	Emuls. 1 <sup>b</sup> a. 50° erhitzt	+ 2'
98	900	6	4,0 "	dgl.	Leichte Krämpfe
101	900	derselbe Extr.	8 "		Keinerlei Sympt.
102	1000	a. die Hälfte bei	5 "	Emuls. 1 <sup>b</sup> a. 50° erhitzt	+ 2'
103	1350	50° eingeengt	7 "	dgl.	+ 1'
104	1200	und filtriert	5 "	"	Leichte Sympt.
105	830	7	6,5 "		+ 5'
115	800	7	6 "	Emuls. 1 <sup>b</sup> a. 50° erhitzt	+ 5'
107	810	7	5 "	dgl.	Keinerlei Sympt.
133	910	derselbe Extr. auf	10 "		dgl.
126	1330	die Hälfte bei 50° eingeengt u. filtr.	10 "	Emuls. 1 <sup>b</sup> a. 50° erhitzt	+ 3'
18 A	950	3	4 "		+ 4'
17 A	975	3	4 "	Emuls. 1 <sup>b</sup> a. 50° erhitzt	+ 2'
15 A	940	3	3,5 "	dgl.	Leichte Krämpfe
20 A	1100	derselbe Extr.	5 "		Keinerlei Sympt.
23 A	1240	a. die Hälfte bei	10 "		dgl.
19 A	1020	50° eingeengt	5 "	Emuls. 1 <sup>b</sup> a. 50° erhitzt	+ 20"
22 A	1350	und filtriert	3,5 "	dgl.	Keinerlei Sympt.
20a	1305	8	10 "		+ 4'
21	1300	8	10 "	Emuls. 1 <sup>b</sup> a. 50° erhitzt	+ 3'
19	1250	8	9 "	dgl.	Leichte Krämpfe
36	1120		10 "		Keinerlei Sympt.
40	905	derselbe Extr.	8 "		dgl.
35	950	a. die Hälfte bei	10 "		
32	805	50° eingeengt	6,2 "	Emuls. 1 <sup>b</sup> a. 50° erhitzt	+ 50"
33	1225	und filtriert	6,2 "	dgl.	Leichte Sympt.
39	750		4 "	"	Schw. Krämpfe, erholt sich

## Versuchsreihe III.

Kaninchen No.	Gewicht in g	Methylalkoholischer Extrakt aus  No. 2	Iv. eingespr. Emuls. v. 1 Teil methylalk. Extr. in 4 Teilen 0,85- proz. NaCl-Lösung	Bemerkungen	Resultat
65 A	1060		13 ccm	Emulsion nicht erhitzt	Keinerlei Symptome
60 A	1110		10 "	Emuls. 1 <sup>b</sup> auf 50° erhitzt	+ 30"
62 A	1170		8 "	dgl.	+ 20"
64 A	890		6 "	"	+ 20"
63 A	940		4 "	"	+ 15"
66 A	930		3 "	"	Starke Krämpfe, erholt sich

Kaninchen No.	Gewicht in g	Methylalkoholischer Extrakt aus	iv. eingespr. Emuls. v. 1 Teil methylalk. Extr. in 4 Teilen 0,85-proz. NaCl-Lösung	Bemerkungen	Resultat
3 B	1240	Rinderhod. No. 3	10 ccm	Emulsion nicht erhitzt	Keinerlei Symptome
2 B	1100		5 "	dgl.	dgl.
1 B	1020		5 "	Emuls. 1 <sup>b</sup> auf 50° erhitzt	† 3'
4 B	1350		3,5 "	dgl.	† 4"
5 B	1320		3 "	"	Leichte Krämpfe
9	900	Hundehod. No. 1	5 "	Emulsion nicht erhitzt	Keinerlei Symptome
36	800		3,5 "	dgl.	dgl.
2	920		5 "	Emuls. 1 <sup>b</sup> auf 50° erhitzt	† 5'
12	900		4 "	dgl.	† 50"
6	890		3,5 "	"	Keinerlei Symptome
78	1040	Hundehod. No. 3	15 "	Emulsion nicht erhitzt	Leichte Krämpfe
70	1230		11 "	dgl.	Keinerlei Symptome
66	1230		5 "	Emuls. 1 <sup>b</sup> auf 50° erhitzt	† 3'
75	1250		4 "	dgl.	† 4'
74	1210		3 "	"	Keinerlei Symptome
4 E	1000	Meersch.-Hoden No. 1	6 "	Emulsion nicht erhitzt	Leichte Krämpfe
5 E	990		5 "	dgl.	Keinerlei Symptome
7 E	970		3 "	Emuls. 1 <sup>b</sup> auf 50° erhitzt	† 20"
9 E	1010		2 "	dgl.	† 1'
8 E	1000		1,5 "	"	Starke Krämpfe, erholt sich
10 E	1200		1 "	"	Keinerlei Symptome
25 E	900	Meersch.-Hod. No. 2	5 "	Emulsion nicht erhitzt	Leichte Krämpfe
26 E	870		4 "	dgl.	Keinerlei Symptome
30 E	840		4 "	Emuls. 1 <sup>b</sup> auf 50° erhitzt	† 1'
32 E	920		2 "	dgl.	† 2'
37 E	930		1,5 "	"	Leichte Krämpfe
14 E	1000	Kan.-Hod. No. 1	5 "	Emulsion nicht erhitzt	Starke Krämpfe, erholt sich
17 E	1050		4 "	dgl.	Leichte Krämpfe
18 E	1030		3 "	Emuls. 1 <sup>b</sup> auf 50° erhitzt	† 20"
15 E	990		1 "	dgl.	† 1'
19 E	1050		0,5 "	"	Starke Krämpfe, erholt sich
16 E	840	Kan.-Hoden No. 2	5 "	Emulsion nicht erhitzt	Starke Krämpfe, erholt sich
21 E	770		4 "	dgl.	Keinerlei Symptome
20 E	850		2 "	Emuls. 1 <sup>b</sup> auf 50° erhitzt	† 1'
22 E	1000		1 "	dgl.	† 1'
23 E	950		0,5 "	"	Starke Krämpfe, erholt sich
24 E	1010		0,7 "	"	Leichte Krämpfe

Versuchsreihe IV.

- Kaninchen No. 52, 1490 g.**  
 1,5 ccm gesättigte NaCl-Lösung iv.<sup>1)</sup> Keinerlei Symptome  
 nach 2' 8 ccm  $\frac{1}{8}$  Emulsion methylalk. Extraktes aus Rinderhoden No. 10a, 1 St. auf 50° erhitzt, iv. (T.M. [tödl. Minimaldosis] = 6,6 ccm) Leichte Krämpfe, erh. sich
- Kontrolle: Kaninchen No. 50, 990 g.**  
 4,4 ccm  $\frac{1}{8}$  Emulsion methylalk. Extraktes aus Rinderhoden No. 10a, 1 St. auf 50° erhitzt, iv. † 50"
- Kaninchen No. 69, 1125 g.**  
 1,5 ccm gesättigte NaCl-Lösung<sup>2)</sup> iv. Keinerlei Symptome  
 nach 1' 6 ccm  $\frac{1}{8}$  Emulsion methylalk. Extraktes aus Rinderhoden No. 10a, 1 St. auf 50° erhitzt, iv. (T.M. = 6 ccm) † 2'
- Kaninchen No. 63, 2150 g.**  
 2,5 ccm gesättigte NaCl-Lösung<sup>2)</sup> iv. Keinerlei Symptome  
 nach 1' 11,7 ccm  $\frac{1}{8}$  Emulsion methylalk. Extraktes aus Rinderhoden No. 10a, 1 St. auf 50° erhitzt, iv. (T.M. = 9,6 ccm) Keinerlei Symptome
- Kaninchen No. 60, 725 g.**  
 0,8 ccm gesättigte NaCl-Lösung<sup>2)</sup> iv. Keinerlei Symptome  
 nach 1' 3,9 ccm  $\frac{1}{8}$  Emulsion methylalk. Extraktes aus Rinderhoden No. 10a, 1 St. auf 50° erhitzt, iv. (T.M. = 3,6 ccm) Keinerlei Symptome
- Kontrolle: Kaninchen No. 68, 1005 g.**  
 4,5 ccm  $\frac{1}{8}$  Emulsion methylalk. Extraktes aus Rinderhoden No. 10a, 1 St. auf 50° erhitzt, iv. † 5'
- Kaninchen No. 56.**  
 2 ccm gesättigte NaCl-Lösung<sup>2)</sup> iv. Keinerlei Symptome  
 nach 2' 20 ccm  $\frac{1}{8}$  Emulsion methylalk. Extraktes aus Rinderhoden No. 9a, 1 St. auf 50° erhitzt, iv. Keinerlei Symptome
- Kontrolle: Kaninchen No. 55, 1560 g.**  
 17 ccm  $\frac{1}{8}$  Emulsion methylalk. Extraktes aus Rinderhoden No. 9a, 1 St. auf 50° erhitzt, iv. † 4'

1) Die intravenöse NaCl-Injektion erfolgte langsam: 1 ccm pro Minute.  
 Die Reinjektion geschah in dasselbe Gefäß.

2) Gesättigte NaCl-Lösung + 1 Proz. CaCl<sub>2</sub>.

## Versuchsreihe V.

Kaninchen No.	Gewicht in g	Rinderhoden-Extr. No.	Eingespritzte $\frac{1}{5}$ Emulsion in ccm	Bemerkungen	Blutentnahme zur Komplementtitration vor oder nach der Injektion	Hämolyse mit Komplementmengen in 2,5 ccm Volumen <sup>1)</sup>					Bemerkungen
						0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	
53	880	8a	10	nicht erhitzt	vor nach	K <sup>2)</sup> K	+ <sup>2)</sup> K	+++ <sup>2)</sup> K	++++ <sup>2)</sup> K	++++ <sup>2)</sup> K	} † in 1'
55	1560	9a	17	1 <sup>h</sup> auf 50° erhitzt	vor nach	K 0	+ 0	++ K	+++ K	+++ K	} † in 4'
58	1900	10	16	dgl.	vor nach	++ +	+++ ++	+++ +++	+++ +++	+++ +++	} Keinerlei Symptome
59	1700	10	10	"	vor nach	+ K	++ +	+++ ++	+++ +++	+++ +++	} Keinerlei Symptome
68	1005	10a	4,5	"	vor nach	++ K	++ +	+++ ++	+++ ++	+++ ++	} † in 5'
70	2150	10a	8,2	"	vor nach	++ ++	+++ ++	+++ +++	+++ +++	+++ +++	} St. Krämpfe erholt sich
68a	1100	10a	3	nicht erhitzt	vor nach	++ +	+++ ++	+++ +++	+++ +++	+++ +++	} Keinerlei Symptome
70a	1005	10a	1,4	1 <sup>h</sup> auf 50° erhitzt	vor nach	++ K	+++ +	+++ +	+++ ++	+++ ++	} Keinerlei Symptome

## Versuchsreihe VI.

Kan. No.	Gewicht	Behandlung	Resultat
64	890 g	4 ccm $\frac{1}{5}$ Emuls. methylalk. Extr. aus Rinderhoden No. 2, 1 St. auf 50° erhitzt, iv.	† 2'
65	900	„ do. do. + 0,1 ccm Kan.-Serum iv.	† 1'
66	930	„ do. do. + 0,5 „ „ „	† 3'
67	925	„ do. do. + 1,0 „ „ „	† 3'
68 A	980	„ do. do. + 2,0 „ „ „	† 1' 15"
69	940	„ do. do. + 5,0 „ „ „	† 5'
7	860	„ 5 ccm $\frac{1}{5}$ Emuls. methylalk. Extr. aus Hundehoden No. 2, 1 St. auf 50° erhitzt, iv.	† 3'
25	860	„ do. do. + 4 ccm Kan.-Serum iv.	† 2'
70	1310	„ 5 ccm $\frac{1}{5}$ Emuls. methylalk. Extr. aus Rinderhoden No. 3, 1 St. auf 50° erhitzt, iv.	† 5'
71	1525	„ do. do. + 3 ccm Kan.-Serum iv.	† 4'

1) 1 ccm 5-proz. Blutkörperchenaufschwemmung + 0,2 ccm  $\frac{1}{30}$  verdünnten Kaninchen-Rinderambozeptor (= 50 Ambozeptoreinheiten) + 0,85-proz. NaCl-Lösung bis 2,5 ccm.

2) K = Kuppe; + = geringe Hämolyse; ++ = fast komplette Hämolyse; +++ = komplette Hämolyse.

Kan. No.	Ge- wicht	Behandlung	Resultat
25	790 g	6 ccm $\frac{1}{8}$ Emuls. methylalk. Extr. aus Rinderhoden No. 8a, 1 St. auf 50° erhitzt, iv.	+ 5'
26	810 „	6,1 „ do. do. + 0,1 ccm Kan.-Serum iv.	+ 4'
27	830 „	6,2 „ do. do. + 0,5 „ „ „	+ 2'
29	810 „	6,1 „ do. do. + 1,0 „ „ „	+ 5'
30	800 „	6 „ do. do. + 5,0 „ „ „	+ 1'
31	820 „	6 „ do. do. + 10,0 „ „ „	+ 8'
45	900 „	7 ccm $\frac{1}{8}$ Emuls. methylalk. Extr. aus Rinderhoden No. 8a, 1 St. auf 50° erhitzt, iv.	+ 5'
47	900 „	7 „ do. do. + 10 ccm Kan.-Serum iv. } 1 Stde.	+ 3'
48	870 „	6,9 „ do. do. + 20 „ „ „ } bei 37°	+ 2'

## Versuchsreihe VII.

Kaninchen No. 1 C, 1020 g.

5 ccm  $\frac{1}{8}$  Emulsion methylalk. Extr. aus Rinderhoden No. 4, 1 St. auf 50° erhitzt, iv. † 4'

Kaninchen No. 5 C, 1100 g.

4 ccm  $\frac{1}{8}$  Emulsion methylalk. Extr. aus Rinderhoden No. 4, 1 St. auf 50° erhitzt, iv. Keinerlei Symptome  
nach 30' 4 ccm do. do., iv. do. do.  
nach weiteren 20' 5 ccm do. do., iv. † 2'

Kaninchen No. 4 C, 1140 g.

15,4 ccm  $\frac{1}{8}$  Emulsion methylalk. Extr. aus Rinderhoden No. 4, nicht erhitzt, iv. † 5'

Kaninchen No. 6 C, 1450 g.

5,5 ccm  $\frac{1}{8}$  Emulsion methylalk. Extr. aus Rinderhoden No. 4, nicht erhitzt, iv. Keinerlei Symptome  
nach 30' 19,5 ccm do. do. iv. † 3'

Kaninchen No. 12 A, 1000 g.

10 ccm  $\frac{1}{8}$  Emulsion methylalk. Extr. aus Rinderhoden No. 8a, 1 St. auf 50° erhitzt, iv. † 1'

Kaninchen No. 14 A, 1100 g.

2 ccm  $\frac{1}{8}$  Emulsion methylalk. Extr. aus Rinderhoden No. 8a, 1 St. auf 50° erhitzt, iv. Keinerlei Symptome  
nach 10' 4 ccm do. do., iv. do. do.  
nach weiteren 20' 6 ccm do. do., iv. do. do.  
nach weiteren 40' 11 ccm do. do., iv. † 2'

Kaninchen No. 15 A, 1200 g.

4 ccm  $\frac{1}{8}$  Emulsion methylalk. Extr. aus Rinderhoden No. 8a, 1 St. auf 50° erhitzt, iv. keinerlei Symptome  
nach 5' 5 ccm do. do., iv. do. do.  
nach weiteren 20' 6 ccm do. do., iv. do. do.  
nach weiteren 60' 12 ccm do. do., iv. † 4'

## Versuchsreihe VIII.

Kaninchen No.	Datum	Gewicht in g	Eingespritzte Emulsion in ccm	Hodenextrakt No.	Bemerkungen	Resultat
31 A	25. X.	1265	10	6	1 <sup>b</sup> auf 50° erhitzt	Keinerlei Symptome
	26. X.	1260	10	6 a	dgl.	Leichte Symptome
	1. XI.	1050	10	7 a	"	Keinerlei Symptome
32 A	25. X.	1310	10	6		dgl.
	26. X.	1300	10	6 a	1 <sup>b</sup> auf 50° erhitzt	"
	27. X.	1200	12	6 a	dgl.	"
	1. XI.	1000	10	7 a	"	"
33 A	25. X.	1350	10	6	"	"
	26. X.	1350	10	6 a	"	"
39 A	26. X.	1460	11	6 a		"
	27. X.	1430	11	6 a	1 <sup>b</sup> auf 50° erhitzt	"
70	22. XI.	2150	8,2	10 a	dgl.	Schwere Sympt., erholt sich
	28. XI.	2130	21	11 a	"	Keinerlei Symptome
	30. XI.	1780	11,1	12 a	"	† 1'
68 a	24. XI.	1110	3	10 a		Keinerlei Symptome
	2. XII.	865	5,8	12 a	1 <sup>b</sup> auf 50° erhitzt	† 2'
70 a	24. XI.	1005	1,4	10 a	dgl.	Keinerlei Symptome
	30. XI.	865	8,6	11 a	"	dgl.
	3. XII.	860	5,7	12 a	"	† 1'
79	28. XI.	770	2	11 a		Keinerlei Symptome
	4. XII.	820	5,4	12 a	1 <sup>b</sup> auf 50° erhitzt	† 4'
78 D	28. XI.	890	2	11 a	dgl.	Keinerlei Symptome
	4. XII.	840	5,6	12 a	"	† 4'
8 D	30. XI.	1140	8	11 a	"	Keinerlei Symptome
	3. XII.	1035	6,8	12 a	"	† 1'
58	23. XI.	1900	16	10 a	"	Keinerlei Symptome
	30. XI.	1865	18,5	11 a	"	† 2'
18 D	30. XI.	1645	14,5	11 a	"	Keinerlei Symptome
	3. XII.	1580	10,2	12 a	"	† 1'
88	2. XII.	955	3,6	11 a	"	Schwere Sympt., erholt sich
	4. XII.	870	5,9	12 a	"	Sehr schwere Symptome, erholt sich
Kontrollen.						
38 A	26. X.	740	5	6 a	1 <sup>b</sup> auf 50° erhitzt	† 20"
36 A	26. X.	1310	10	6 a	dgl.	† 30"
41 A	27. X.	1130	9	6 a	"	† 30"
51 A	1. XI.	1330	10	7 a	"	† 30"
68	22. XI.	1005	4,5	10 a	"	† 5'
69 a	24. XI.	1040	2,8	10 a	"	† 6'
81	30. XI.	990	10	11 a	"	† 4'
90	3. XII.	905	6	12 a	"	† 2'
41	30. XI.	1530	15	11 a	"	† 5'
42	30. XI.	1945	19,5	11 a	"	† 5'
44	30. XI.	1570	15,5	11 a	"	† 3'



### **Zusammenfassung.**

Die Arbeit enthält Untersuchungen über die toxische Wirkung methylalkoholischer Hodenextrakte (Symptomenkomplex, Komplementverarmung, Vergleich homo- und heterologer Extrakte, Einfluß vorheriger Injektion konzentrierter Kochsalzlösung, sowie subletaler Extraktmengen, entfernte Giftwirkung).

---

*Nachdruck verboten.*

[Aus der bakteriol. Abteilung der Staatsmedizinischen Anstalt (Vorsteher: Prof. A. Pettersson) und der pädiatrischen Klinik des Karolinischen Instituts (Chef: Prof. O. Medin) Stockholm.]

### **Ueber die elektrische Erregbarkeit der motorischen Nerven während des anaphylaktischen Zustandes.**

Von Privatdozent Dr. **Carl A. Kling.**

(Eingegangen bei der Redaktion am 18. Januar 1912.)

Das Anaphylaxieproblem, das gegenwärtig vielleicht mehr als ein anderes die Aufmerksamkeit des Serologen und Immunitätsforschers auf sich zieht, hat nun begonnen, mehr und mehr auch den Kliniker zu beschäftigen. Schon sind mehrere Krankheitszustände beim Menschen, die ihrer Ursache nach bisher in Dunkel gehüllt waren, durch die Anaphylaxielehre in ein klares Licht gestellt worden. So haben wir, um einige Beispiele anzuführen, durch dieselbe einen interessanten Einblick in das Wesen der Serumkrankheit erhalten; die Ueberempfindlichkeit tuberkulöser Organismen gegen Tuberkulin ist leicht verständlich geworden. Das Heufieber, gewisse akute Exantheme werden als anaphylaktische Symptome gedeutet, und mehrere der bisher ganz unverständlichen Idiosynkrasien scheinen gleichfalls eine ungezwungene Erklärung erhalten zu haben.

Auch innerhalb der Pathologie des frühen Kindesalters sind mehrere Krankheitsformen anzutreffen, die den Gedanken an eine Anaphylaxie nahelegen. Das scheint mir besonders mit dem Krankheitszustand der Fall zu sein, der unter der Bezeichnung Spasmophilie (Heubner), spasmophile Diathese (Finkelstein) oder Tetania infantum (Escherich) bekannt ist. Vor allem bieten die Bedingungen für das Auftreten

des anaphylaktischen und des spasmophilen Zustandes interessante Vergleichspunkte dar. Wird in den Organismus des Versuchstieres ein artfremder Eiweißkörper eingeführt, so tritt nach einer gewissen Zeit das Tier in ein Stadium von Ueberempfindlichkeit gegen denselben Stoff ein, es ist anaphylaktisch geworden. Wird der Säugling mit Kuhmilch oder, mit anderen Worten, mit einer artfremden Nahrung aufgezogen, so hat er nach Finkelstein (1) große Aussichten, in einen Zustand elektrischer Uebererregbarkeit, die ja eines der spasmophilen Symptome ist, zu gelangen. So fand er krankhaft gesteigerte Kathodenöffnungszuckungswerte in 55,7 Proz. von mit Kuhmilch ernährten Kindern. Bei reinen Brustkindern ist die Krankheit dagegen eine außerordentlich seltene Erscheinung.

Man fragt sich nun: Ist es möglich, daß die enteral eingeführte Kuhmilch bei dem Kinde eine Anaphylaxie hervorrufen kann? Wir müssen da sogleich zugeben, daß dies vorerst nur eine Annahme ist; bisher liegt keinerlei Beweis dafür vor. Doch findet sich Verschiedenes, was sowohl in den Tierversuchen als in den klinischen Experimenten in diese Richtung weist.

Daß Tiere durch orale Einverleibung der artfremden Eiweißsubstanz anaphylaktisch gemacht werden können, ist von mehreren Forschern angegeben worden. Rosenau und Andersson (2) fütterten Meerschweinchen mit Pferdefleisch, wodurch diese überempfindlich gegen Pferdeserum wurden. Zu demselben Ergebnis gelangten Clintock und King (3); sie betonten jedoch die Notwendigkeit, die Fütterung zu wiederholen, um eine Anaphylaxie zu bewirken. Laroche, Richet Fils und Saint-Giron (4) ist es neulich gelungen, durch Fütterung mit roher Kuhmilch Kaninchen zu sensibilisieren; sie erhielten sogar positives Resultat in 70 Proz. der Fälle.

Auch der etwas ältere Zweig der Immunitätsforschung, der sich mit der Präzipitinbildung beschäftigt hat, gewährt uns interessante Anhaltspunkte zur Beurteilung der vorliegenden Frage. Bordet (5) konnte schon 1899 zeigen, daß Kaninchen, denen er zu wiederholten Malen Kuhmilch injiziert hatte, eine Veränderung in der Weise erfuhren, daß ihre Sera nun das Vermögen besaßen, eine Fällung in Kuhmilch hervorzurufen. Hamburger (6) gelang es einige Jahre später, mittelst derselben Methode das Vorhandensein zweier verschiedener Eiweißstoffe, Kasein und Albumin, in der Kuhmilch nachzuweisen, und gründete auf Bordets und seine eigenen Versuche seine bekannte Theorie von der Minderwertigkeit der Kuhmilch als Nahrungsmittel für den Säugling. Der Unterschied zwischen der natürlichen und der künstlichen Ernährung ist der, sagt Hamburger, daß in dem ersteren Falle das Kind Eiweiß seiner eigenen Art erhält, während es im letzteren Falle ein fremdes Eiweiß erhält, das auf die Darmschleimhaut wie ein Gift wirkt. Um die Theorie zu stützen, versuchte Hamburger später zusammen mit Moro (7) bei dem mit Kuhmilch ernährten Kinde Präzipitin im Blute nachzuweisen, ohne daß es ihnen indessen gelang (1903). Moro (8) setzte jedoch die Forschungen fort und teilte 1906

mit, daß er bei Untersuchungen des Blutes 22 atrophischer Kinder Laktoserumreaktion in zwei Fällen beobachtet habe. Im selben Jahre machte auch Bauer (9) ähnliche Befunde. Diese Beobachtungen scheinen also dafür zu sprechen, daß die fremden Bestandteile in der Kuhmilch unter gewissen Umständen die Darmwand des Säuglings passieren, in die Blutbahn eindringen und zur Bildung von Immunkörpern Anlaß geben können, und damit ist wohl auch die Möglichkeit zu einer Sensibilisierung auf demselben Wege gegeben.

Gehen wir nun in unserem Vergleiche zwischen der Anaphylaxie und der Spasmophilie weiter und wenden uns den Symptomen bei den beiden Zuständen zu, so finden wir noch weitere Berührungspunkte. Sowohl während des anaphylaktischen Shocks als bei der manifesten Spasmophilie treten Krampfsymptome in den Vordergrund, und dies gilt nicht nur von allgemeinen, sondern auch von mehr lokalisierten Krämpfen. In dem einen wie in dem anderen Falle werden demnach die hauptsächlichsten Symptome von dem Nervensystem her ausgelöst. Daß der pathologische Prozeß, der in dem anaphylaktischen Shock zum Ausdruck kommt, vor allem sich im Zentralnervensystem abspielt, scheinen Besredkas (10) interessante Narkosenversuche zu zeigen: anaphylaktische Meerschweinchen, die mit Aether narkotisiert werden, vertragen eine intracerebrale Seruminjektion ohne irgendwelche anaphylaktische Symptome. Achard und Flaudin (11) haben außerdem neulich die Gegenwart von Anaphylaxiegift im zentralen Nervensystem während des Shocks selbst nachweisen können. Charakteristisch für den spasmophilen Zustand ist eine mechanische, elektrische und psychische Uebererregbarkeit des Nervensystems.

Das Angeführte möge genügen, um zu zeigen, daß die Anaphylaxie bei dem Versuchstier eine keineswegs unbedeutende Aehnlichkeit mit der spasmophilen Diathese bei dem Säugling darbietet. Es scheint mir daher ein großes Interesse zu besitzen, genauer zu prüfen, ob diese Anomalie im frühen Kindesalter als eine wirkliche Ueberempfindlichkeitskrankheit zu betrachten ist oder nicht. Zwei Wege stehen uns zu dieser Prüfung offen. Der eine führt uns in die Klinik. Es gilt hier zu untersuchen, ob die für den anaphylaktischen Zustand charakteristischen Symptome auch bei dem spasmophilen Kinde vorkommen, ob z. B. ein anaphylaktischer Reaktionskörper<sup>1)</sup> im Blute desselben nachgewiesen werden kann, ob

1) Eine solche Untersuchung ist gegenwärtig im Gange, und ich glaube bereits ein positives Resultat erhalten zu haben, das ich hier in Kürze mitteilen will. Ein 6 Monate alter Knabe, I. L., wurde am 13. II. 1911 in das öffentliche Kinderhaus in Stockholm aufgenommen. Er war vor der Aufnahme mit Kuhmilch aufgezogen worden, war nun ein kleines, blasses Kind mit schlecht entwickeltem Fettpolster und rachitischen Symptomen. Er bekam auch weiter Kuhmilch ( $\frac{2}{3}$  Kuhmilch +  $\frac{1}{3}$  Hafer-

Blutveränderungen im übrigen konstatiert werden können, die für die Anaphylaxie kennzeichnend sind, ob nicht vielleicht der Fieberanstieg, der häufig gleichzeitig mit den Krampfausbrüchen auftritt, als eine anaphylaktische Reaktion zu betrachten ist usw. Der andere Weg führt uns zum Tierversuch; bei dem anaphylaktischen Tiere können wir möglicherweise eines oder einige der für die Spasmophilie charakteristischen Merkmale wiederfinden. Der Tierversuch muß natürlich den Ausgangspunkt für eine derartige Untersuchung bilden.

Als das wichtigste, das konstanteste und früheste Symptom bei infantiler Tetanie bezeichnen Escherich (12) u. a. eine Steigerung der elektrischen Erregbarkeit des Nervensystems. Es schien mir daher zweckmäßig, zuerst zu untersuchen, wie diese sich bei dem Versuchstier während des normalen und des anaphylaktischen Zustandes verhält.

\* \* \*

Als Versuchstiere wurden Kaninchen gewählt. Da es a priori zu erwarten war, daß die elektrische Erregbarkeit des Nervensystems sich verschieden bei jüngeren und älteren In-

schleim, 900 g pro Tag). Am 25. II. zeigte er deutliches Facialisphänomen, Andeutung zu Trousseau's Symptom. Bei Untersuchung mit dem galvanischen Strom trat Kathodenschließungszuckung bei 0,9, Anodenschließungszuckung bei 1,1 und Kathodenöffnungszuckung schon bei 1,8 Milliampère ein. Am 27. II. ein leichter Laryngospasmus. Am 1. III. wurde Blut von dem Patienten entnommen, und 2,2 ccm Serum wurden intraperitoneal einem 330 g wiegenden Meerschweinchen eingespritzt. 24 Stunden danach erhielt das Meerschweinchen intravenös 1 ccm Milchmischung von derselben Zusammensetzung wie die, mit der das Kind aufgezo-gen wurde. Das Tier zeigte gleich nach der Injektion Dyspnoë, leichten Krampf, Harn- und Faecesabgang, gestäubte Haare und sah sehr schlecht aus. Die Temperatur, die vor der Injektion 38,4° betragen hatte, sank allmählich und betrug nach 1¼ Stunden nur noch 32,4°. Danach stieg sie wieder, das Tier erholte sich und war am folgenden Tage gesund. Ein Kontrolltier, dem intravenös dieselbe Menge Kuhmilchmischung injiziert wurde, zeigte keine anaphylaktischen Symptome, nur eine Temperatursenkung von 1° C. Am 27. III. bekam das Kind einige kurzdauernde Anfälle von allgemeinen Konvulsionen; einige Stunden danach wurde noch einmal Blut von demselben entnommen, und mit 4 ccm des inaktivierten Serums wurde derselbe Versuch wie das vorhergehende Mal angestellt. Auch jetzt reagierte das Versuchstier mit Dyspnoë, Harn- und Faecesabgang; der Temperaturfall betrug jedoch bei dieser Gelegenheit nur 2,6° C, die Reaktion war in ihrer Gesamtheit gelinder als bei der ersten Serumprüfung. Ein Kontrolltier zeigte keine Reaktion.

dividuen analog dem Verhältnis beim Menschen verhalten würde, wurden in die Versuchsserie kleinere und größere Tiere aufgenommen, deren Anfangsgewicht zwischen 1100 und 3400 g variierte.

Zur Bestimmung der elektrischen Erregbarkeit wurde der galvanische Strom benutzt. Die Prüfung wurde in Uebereinstimmung mit der in der Klinik praktizierten Methode folgendermaßen angestellt.

Das Kaninchen wurde auf einem gewöhnlichen Operationstisch festgebunden, das eine Vorderbein dabei freigelassen. An den Stellen, wo die Elektroden plaziert werden sollten, wurden die Haare weggeschnitten, und die Haut wurde mit Kochsalzlösung angefeuchtet. Ein Assistent legte mit der einen Hand eine indifferente Elektrode von 50 qcm Oberfläche auf dem Bauche an und moderierte die Stromstärke mit der anderen. An dem freien Beine, das mit der einen Hand fixiert gehalten wurde, wurde eine kugelförmige Elektrode von ungefähr  $\frac{1}{2}$  cm Durchmesser dicht oberhalb der Ellenbogenfalte im Sulcus bicipitalis, wo der Nervus medianus der Haut nahe liegt, angesetzt. Die Stromstärke wurde mit einem gewöhnlichen Horizontalgalvanometer gemessen.

Bei Plazierung der Elektroden in der obenerwähnten Weise entstehen bei Schließung und Oeffnung des elektrischen Stromes, wenn dessen Stärke eine gewisse Höhe erreicht hat, Muskelkontraktionen, die sich durch eine Beugung des Fußgelenkes zu erkennen geben. Schon bevor die sichtbaren Kontraktionen sich einstellen, kann man mittelst des Tastgefühls Zusammenziehungen wahrnehmen. Die Werte, die sich in den Tabellen angegeben finden, beziehen sich indessen sämtlich auf die deutlich sichtbare Beugung des Fußgelenkes. Im allgemeinen ist es leicht, die Reizschwelle für die Kathodenschließungs-, Anodenschließungs- und die Anodenöffnungszuckung zu bestimmen, schwieriger dagegen, die Grenze für die Kathodenöffnungszuckung festzustellen, welche letzteres ja auch beim Menschen der Fall ist. Beim Kaninchen tritt nämlich ziemlich bald ein Kathodenschließungstetanus ein; der Fuß steht in einer tetanischen Beugestellung. Wird der Strom dann geöffnet, erschlaffen die Muskeln, und dem Ungeübten kann möglicherweise diese Erschlaffung als eine Oeffnungszuckung erscheinen. Wenn der Strom hinreichend stark geworden ist, so stellt sich jedoch auch bei Oeffnung eine deutliche Beugung des Fußgelenkes ein.

Um die Versuchstiere in den anaphylaktischen Zustand zu versetzen, ist die von Friedemann (13) angegebene und auch von Friedberger (14) angewandte Methode der Hauptsache nach befolgt worden. Als Antigen wurde rohe Kuhmilch, möglichst frisch, in einer Dosis von 3 ccm pro kg Körpergewicht, intravenös genommen. Nach ungefähr einem Monat wurde Reinjektion gemacht, im allgemeinen 4 ccm

Tabelle I.

No.	Gewicht	Sensibilisierung	Reinjektion	Serumprüfung	Elektrische Reizbarkeit				
					Zeit	K.S.Z.	A.S.Z.	Z.O.Z.	K.O.Z.
14. VIII.	1950 g	5. VIII. 5,8 ccm rohe Kuhmilch intrav. Keine Reaktion.	0. Gestorben den 4. IX.	—	4. VIII.	1,1	3	2,5	16
24. VIII.	2230 g	5. VIII. 6,6 ccm rohe Kuhmilch intrav. Keine Reaktion.	0. Gestorben den 4. IX.	—	4. VIII.	2	3,8	6	20
34. VIII.	2920 g	5. VIII. 8,7 ccm rohe Kuhmilch intrav. Keine Reaktion.	7. IX. 12 <sup>35</sup> nachm. 6,2 ccm rohe Kuhmilch intravenös. Mäßige Dyspnoë.	14. IX. Meersch., 350 g. 4 ccm inaktiviertes Serum von No. 3 intraperitoneal.	4. VIII.	1,5	2,2	3,8	12
7. IX.	3130 g	5. VIII. 8,7 ccm rohe Kuhmilch intrav. Keine Reaktion.	7. IX. 12 <sup>35</sup> nachm. 6,2 ccm rohe Kuhmilch intravenös. Mäßige Dyspnoë.	15. IX. 7 <sup>05</sup> nachm. 1 ccm rohe Kuhmilch intrav. Schwere Dyspnoë, Husten, Abgang von Harn, gestäubte Haare. Temperatur vor der Injekt. 38,8°, 7 <sup>20</sup> 35°, 7 <sup>35</sup> 33,6°, 7 <sup>50</sup> 32,6° (sehr schlecht), 8 <sup>05</sup> 33,5° (besser).	5. IX.	0,4	1,2	0,8	5-6
				16. IX. Lebte, gesund.	7. IX.	0,3	1,4	0,8	3,2
44. VIII.	2400 g	5. VIII. 7,2 ccm rohe Kuhmilch intrav. Keine Reaktion.	7. IX. 12 <sup>45</sup> nachm. 7,5 ccm rohe Kuhmilch intraven. Gleich nach der Injektion legt sich das Tier; schwere Dyspnoë.	14. IX. Meersch., 350 g. 4 ccm inaktiv. Ser. vom Kaninch. No. 4 intraperitoneal.	4. VIII.	2,2	3,5	8	12
7. IX.	2510 g	5. VIII. 7,2 ccm rohe Kuhmilch intrav. Keine Reaktion.	7. IX. 12 <sup>45</sup> nachm. 7,5 ccm rohe Kuhmilch intraven. Gleich nach der Injektion legt sich das Tier; schwere Dyspnoë.	15. IX. 7 <sup>15</sup> nachm. 1 ccm rohe Kuhmilch intrav. Gest. nach 3 Min. unter typisch anaphylakt. Sympt. Lungen emphysematös, das Herz schlägt, das Blut flüssig.	5. IX.	0,4	1,8	0,8	3,2
					7. IX.	0,4	1,8	0,8	3
54. VIII.	2100 g	5. VIII. 6,3 ccm rohe Kuhmilch intrav. Keine Reaktion.	0. Gestorben d. 8. VIII.	—	12. IX.	0,6	1,7	0,9	2,5
64. VIII.	1350 g	5. VIII. 4 ccm rohe Kuhmilch intrav. Keine Reaktion.	9. IX. 7,6 ccm rohe Kuhmilch intravenös. Das Tier legt sich. Dyspnoë, Niesen.	22. IX. Meersch., 400 g. 4 ccm inaktiv. Ser. vom Kaninch. No. 6 intraperitoneal.	4. VIII.	0,9	1,2	1,1	12
9. IX.	1900 g	5. VIII. 4 ccm rohe Kuhmilch intrav. Keine Reaktion.	9. IX. 7,6 ccm rohe Kuhmilch intravenös. Das Tier legt sich. Dyspnoë, Niesen.	23. IX. 6 <sup>05</sup> nachm. 1 ccm rohe Kuhmilch intravenös. Unruhe, schwere Dyspnoë, Husten, gestäubte Haare, Jucken. Temperatur vor der Injekt. 39°, um 6 <sup>20</sup> 36°, 6 <sup>35</sup> 37°, 6 <sup>50</sup> 37,2°, 7 <sup>05</sup> 37,9°, 7 <sup>20</sup> 39°.	6. IX.	0,3	1,7	0,6	3,2
				24. IX. Lebte, gesund.	11. IX.	0,7	1,9	0,9	2,6
					18. IX.	0,4	2	1	3
74. VIII.	2100 g	5. VIII. 7,1 ccm rohe Kuhmilch intrav. Keine Reaktion.	7. IX. 1 <sup>30</sup> nachm. 9,7 ccm rohe Kuhmilch intraven. Gleich nach d. Injekt. wird das Tier unruhig, nach einigen Minuten legt es sich, bekommt schwere Dys-	14. IX. Meersch., 350 g. 4 ccm inaktiviertes Serum vom Kaninchen No. 7 intraperitoneal.	4. VIII.	0,5	2	1,8	17
7. IX.	2420 g	5. VIII. 7,1 ccm rohe Kuhmilch intrav. Keine Reaktion.	7. IX. 1 <sup>30</sup> nachm. 9,7 ccm rohe Kuhmilch intraven. Gleich nach d. Injekt. wird das Tier unruhig, nach einigen Minuten legt es sich, bekommt schwere Dys-	15. IX. 7 <sup>30</sup> nachm. 1 ccm rohe Kuhmilch intravenös. Gestäubte Haare, mäßige Dyspnoë, Harnabgang. Temperatur vor der Injekt. 39°, um 7 <sup>45</sup> 37°, 8 <sup>00</sup> 38°, 8 <sup>15</sup> 39°.	5. IX.	0,3	1,6	0,9	3,5
					7. IX.	0,4	1,7	1	3,4
					12. IX.	0,4	1,7	1	3,3

84. VIII. 2200 g 7. IX. 2220 g	5. VIII. 6,6 ccm rohe Kuhmilch intrav. Keine Reaktion.	7. IX. 1 <sup>45</sup> nachm. 8,9 ccm rohe Kuhmilch intravenös. Nist, legt sich auf die Seite und kann nicht dazu gebracht werden, sich zu erheben, schwere Dyspnoë. Nach $\frac{1}{4}$ Stunde besser, erhebt sich.	22. IX. Meersch., 370 g. 4 ccm inaktiviertes Serum vom Kaninchen No. 8 intraperitoneal. 23. IX. 6 <sup>30</sup> nachm. 1 ccm rohe Kuhmilch intravenös. Schüttelfrost, Dyspnoë, gesträubte Haare. Temperatur vor der Injektion 38°, um 6 <sup>45</sup> 37°, 7 <sup>00</sup> 38,8°, 7 <sup>15</sup> 39°.	4. VIII. 0,9,2,9,4,5 5. IX. 0,3,1,2,1,2 7. IX. 0,6,1,4,1,4 200 nachm. 12. IX. 0,5,1,7,1,3	15 3 3,4 3,5
94. VIII. 2130 g 7. IX. 2470 g	5. VIII. 6,4 ccm rohe Kuhmilch intrav. Keine Reaktion.	7. IX. 1 <sup>15</sup> nachm. 9,8 ccm rohe Kuhmilch intravenös. Legt sich, mäßige Dyspnoë. Wird das Tier beunruhigt, so fällt es ihm schwer, sich auf den Beinen zu halten, bewegt sich langsam fort.	22. IX. Meersch., 400 g. 4 ccm inaktiviertes Serum vom Kaninchen No. 9 intraperitoneal. 23. IX. 6 <sup>15</sup> nachm. 1 ccm rohe Kuhmilch intravenös. Schwere Dyspnoë, leichter Krampf, gesträubte Haare. Temperatur vor der Injekt. 39,6°, um 6 <sup>30</sup> 36,7°, 6 <sup>45</sup> 36°, 7 <sup>00</sup> 36°, 7 <sup>15</sup> 36,9°, 7 <sup>30</sup> 37,8°, 7 <sup>45</sup> 38,8°, 8 <sup>00</sup> 39°.	4. VIII. 0,9,3,4,3,4 5. IX. 0,5,1,2,0,9 7. IX. 0,4,1,9,1,1 130 nachm. 12. IX. 0,5,1,4,1	11 2,7 2,5 3
104. VIII. 1370 g 9. IX. 1770 g	5. VIII. 4,1 ccm rohe Kuhmilch intrav. Keine Reaktion.	9. IX. 4,7 ccm rohe Kuhmilch intravenös. Unruhig, Frostanfalle, legt sich, leichte Dyspnoë.	22. IX. Meersch., 380 g. 4 ccm inaktiviertes Serum vom Kaninchen No. 10 intraperitoneal. 23. IX. 5 <sup>55</sup> nachm. 1 ccm rohe Kuhmilch intravenös. Krampf, Husten, Dyspnoë, gesträubte Haare, Harnabgang, legt sich auf die Seite. Temperatur vor der Injektion 39°, um 6 <sup>10</sup> 34,8°, 6 <sup>25</sup> 34,6°, 7 <sup>25</sup> 35,7° (besser), 7 <sup>40</sup> 36,4°, 7 <sup>55</sup> 37,2°.	4. VIII. 0,3,1,2,1 6. IX. 0,6,1,3,1 11. IX. 0,8,1,6,1,4 18. IX. 0,9,1,7,1,4	9-10 3 3,3 3,2
114. VIII. 1600 g 9. IX. 2100 g	5. VIII. 4,8 ccm rohe Kuhmilch intrav. Keine Reaktion.	9. IX. 8,4 ccm rohe Kuhmilch intravenös. Das Tier legt sich auf die Seite, sehr schwere Dyspn., Harnabgang. Nach $\frac{1}{4}$ Std. Krampf, Tod.	24. IX. Lebt, gesund.	4. VIII. 0,9,1,8,2 6. IX. 0,6,1,6,1	13 3,7
124. VIII. 2180 g 9. IX. 2090 g	5. VIII. 6,5 ccm rohe Kuhmilch intrav. Keine Reaktion.	9. IX. 8,3 ccm rohe Kuhmilch intravenös. Legt sich, mäßige Dyspnoë.	28. IX. Meersch., 370 g. 5 ccm inaktiviertes Serum vom Kaninchen No. 12 intraperitoneal. 29. IX. 6 <sup>55</sup> nachm. 1 ccm rohe Kuhmilch intravenös. Schüttelfrost, gesträubte Haare, mäßige Dyspnoë. Temperatur vor der Injekt. 38,8°, um 7 <sup>10</sup> 38,2°, 7 <sup>25</sup> 40°.	4. VIII. 1,2,1,8,2 6. IX. 0,8,2,1,8 11. IX. 0,7,2,1,2 24. IX. 0,2,2,0,9	10 8 7 4



Nr.	Gewicht	Sensibilisierung	Reinjektion	Serumprüfung	Elektrische Reizbarkeit				
					Zeit	K.S.Z.	A.S.Z.	A.O.Z.	K.O.Z.
13	4. VIII. 1250 g	5. VIII. 3,7 ccm rohe Kuhmilch intrav. Keine Reaktion.	9. IX. 6.52 ccm rohe Kuhmilch. Legt sich, Dyspnoë.	28. IX. Meersch., 370 g. 5 ccm inaktiviertes Serum von Kan. Nr. 13 intraperitoneal. 29. IX. 6 <sup>30</sup> nachm. 1 ccm rohe Kuhmilch intraven. Schüttelfrost, gesträubte Haare, nach 5 Minuten Dyspnoë. Temperatur vor der Injektion 39°, um 6 <sup>45</sup> 38,2° (andauernd Dyspnoë), 7 <sup>00</sup> 38,2°, 7 <sup>15</sup> 39,6°. 30. IX. Lebt, gesund.	4. VIII.	1	1,5	0,5	8
	6. IX.				0,51	3,0	0,6	3,3	
	11. IX.				0,41	8,0	0,9	4	
	24. IX.				0,52	0,9		2,5	
14	4. VIII. 1700 g	5. VIII. 5,1 ccm rohe Kuhmilch intrav. Keine Reaktion.	11. IX. 2 <sup>35</sup> nachm. 8,8 ccm rohe Kuhmilch intravenös. Legt sich, Krampf, schwere Dyspnoë, sieht sehr schlecht aus. 2 <sup>55</sup> nachm. andauernd sehr schlecht, kann nicht dazu gebracht werden, aufzustehen. 3 <sup>25</sup> nachm. besser, steht auf.	28. IX. Meersch., 350 g. 5 ccm inaktiviertes Serum vom Kan. No. 14 intraperitoneal. 29. IX. 7 <sup>10</sup> nachm. 1 ccm rohe Kuhmilch intrav. Schüttelfrost, gesträubte Haare, Dyspnoë. Temperatur vor der Injektion 39°, um 7 <sup>25</sup> 40°. 30. IX. Lebt, gesund.	4. VIII.	0,31	1		12
	6. IX.				0,61	4,0	0,9	6	
	11. IX.				0,31	6,1	1,4	4	
	3 <sup>45</sup> nachm. 24. IX.				0,41	2,1		4,4	
15	4. VIII. 1100 g	5. VIII. 3,3 ccm rohe Kuhmilch intrav. Keine Reaktion.	11. IX. 2 <sup>30</sup> nachm. 6,5 ccm rohe Kuhmilch intravenös. Legt sich, parietisch, schwere Dyspnoë, sieht sehr schlecht aus. 3 <sup>25</sup> nachm. besser, steht auf.	28. IX. Meersch., 310 g. 5 ccm inaktiviertes Serum vom Kan. No. 15 intraperitoneal. 29. IX. 7 <sup>30</sup> nachm. 1 ccm rohe Kuhmilch intravenös. Schwere Dyspnoë, gesträubte Haare, Jucken, Harn- und Faecesabgang. Temperatur vor der Injektion 38,6°, um 7 <sup>35</sup> 37°, 7 <sup>50</sup> 38°, 8 <sup>45</sup> 39,6°. 30. IX. Lebt, gesund.	4. VIII.	0,51	1,5	1,5	8-10
	6. IX.				0,72	1,2		5	
	11. IX.				0,62	1		4,2	
	4 <sup>00</sup> nachm. 24. IX.				0,41	8,3	1	3,1	
16	4. VIII. 3300 g	5. VIII. 9,9 ccm rohe Kuhmilch intrav. Keine Reaktion.	11. IX. 2 <sup>45</sup> nachm. 12,9 ccm rohe Kuhmilch intravenös. Unruhig, Jucken, leichte Dyspnoë; nach einigen Minuten legt sich das Tier. 2 <sup>55</sup> nachm. wieder besser, steht auf.	28. IX. Meersch., 370 g. 5 ccm inaktiviertes Serum vom Kan. No. 16 intraperitoneal. 29. IX. 6 <sup>40</sup> nachm. 1 ccm rohe Kuhmilch intravenös. Schüttelfrost, Dyspnoë, etwas gesträubte Haare. Temperatur vor der Injektion 38,2°, um 6 <sup>55</sup> 37,2° (andauernd Dyspnoë), 8 <sup>10</sup> 38,8°. 30. IX. Lebt, gesund.	4. VIII.	1,52	6,2	6	17
	6. IX.				0,72	6,2	2,2	4	
	11. IX.				0,52	2,2		5	
	4 <sup>05</sup> nachm. 30. IX.				0,82	1,2		5	



17	4. VIII. 3400 g 11. IX. 3280 g 2. X. 3760 g	5. VIII. 10,2 ccm rohe Kuhmilch intrav. Keine Reaktion.	11. IX. 2 <sup>65</sup> nachm. 13,1 ccm rohe Kuhmilch intravenös. Unruhig, Dyspnoë, legt sich, Faecesabgang. 2. X. 3 <sup>00</sup> nachm. 15 ccm rohe Kuhmilch intra- venös. Unbedeutende Dyspnoë.	12. X. Meerschw., 300 g. 5 ccm inaktiviertes Serum vom Kan. No. 17 intraperitoneal. 13. X. 6 <sup>45</sup> nachm. 1 ccm rohe Kuhmilch intravenös. Leichte Dyspnoë, ein wenig gesträubte Haare, Schüttelfrost. Tempe- ratur vor der Injektion 39,4°, um 7 <sup>00</sup> 38,8°, 7 <sup>15</sup> 38,6°, 7 <sup>30</sup> 39,4°. 14. X. Lebt, gesund.	4. VIII. 6. IX. 11. IX. 2. X. 2 <sup>45</sup> nachm. 2. X. 3 <sup>45</sup> nachm. 7. X. 9. X.	1,5,3,5,4 0,6,2,5,2 0,4,1,7,0,9 0,4,2 1 3 2,8 1 3 2,8 0,4,2 0,5,2,2,1,7 1,6,2,5,4 0,2,1,2,0,6 0,2,0,9,0,7 0,7,2 1,6 1,6,4 0,6,1,2,0,7 0,6,2,5,2,5,8-10 0,4,1,8,1 0,4,1,3,1 0,4,1,8,1,4 0,6,2 0,5,1,2,1 1,6,3 0,7,2 0,3,1,2,0,8 0,3,3 1,2,4 0,5,2	13 4 2,7 11 18 9,5 7 10 3,1 1,5 5 6 4 10 3,8 4 10 12 6 17 4 4,5 11 12 8
18	4. VIII. 2300 g 11. IX. 2850 g 2. X. 3110 g	5. VIII. 6,9 ccm rohe Kuhmilch intrav. Keine Reaktion.	11. IX. 3 <sup>05</sup> nachm. 11,4 ccm rohe Kuhmilch intravenös. Unruhig, mäßige Dyspnoë. Legt sich. 2. X. 3 <sup>10</sup> nachm. 12,4 ccm rohe Kuhmilch intravenös. Leichte Dyspnoë.	8. X. Meerschw., 320 g. 5 ccm inaktiviertes Serum vom Kan. No. 18. 9. X. 6 <sup>35</sup> nachm. 1 ccm rohe Kuhmilch intra- venös. Gesträubte Haare, leichte Dyspnoë, Temperatur vor der Injektion 38,4°, um 6 <sup>40</sup> 37,4° (andauernd etwas gesträubte Haare, Dyspnoë), 6 <sup>55</sup> 38,4°. 10. X. Lebt, gesund.	4. VIII. 6. IX. 11. IX. 2. X. 3 <sup>00</sup> nachm. 2. X. 3 <sup>55</sup> nachm. 7. X.	1,6,2,5,4 0,2,1,2,0,6 0,2,0,9,0,7 0,7,2 1,6 1,6,4 0,6,1,2,0,7 0,6,2,5,2,5,8-10 0,4,1,8,1 0,4,1,3,1 0,4,1,8,1,4 0,6,2 0,5,1,2,1 1,6,3 0,7,2 0,3,1,2,0,8 0,3,3 1,2,4 0,5,2	10 3,1 1,5 5 6 4 10 3,8 4 10 12 6 17 4 4,5 11 12 8
19	4. VIII. 2200 g 11. IX. 2600 g 2. X. 3020 g	5. VIII. 6,6 ccm rohe Kuhmilch intrav. Keine Reaktion.	11. IX. 3 <sup>35</sup> nachm. 10,4 ccm rohe Kuhmilch intravenös. Legt sich, ziemlich schwere Dys- pnoë. 2. X. 12 ccm rohe Kuhmilch intravenös. Mäßige Dyspnoë, Harn- und Faeces- abgang.	12. X. Meerschw., 300 g. 5 ccm inaktiviertes Serum vom Kan. No. 19 intraperitoneal. 13. X. 7 <sup>00</sup> nachm. 1 ccm rohe Kuhmilch intravenös. Schwere Dyspnoë, Krampf, Jucken, Harn- und Faecesabgang. Tempe- ratur vor der Injektion 39,2°, um 7 <sup>15</sup> 36,8°, 7 <sup>30</sup> 37,5° (sieht andauernd schlecht aus, Dyspnoë jedoch etwas leichter), 8 <sup>00</sup> 37°, 8 <sup>15</sup> 36,5°, 8 <sup>30</sup> 37°. 14. X. Lebt, gesund.	4. VIII. 6. IX. 11. IX. 2. X. 3 <sup>05</sup> nachm. 2. X. 3 <sup>00</sup> nachm. 2. X. 4 <sup>00</sup> nachm. 7. X.	0,6,2,5,2,5,8-10 0,4,1,8,1 0,4,1,3,1 0,4,1,8,1,4 0,6,2 0,5,1,2,1 1,6,3 0,7,2 0,3,1,2,0,8 0,3,3 1,2,4 0,5,2	10 3,8 4 10 12 6 17 4 4,5 11 12 8
20	4. VIII. 2430 g 11. IX. 2740 g 2. X. 3050 g	5. VIII. 7,2 ccm rohe Kuhmilch intrav. Keine Reaktion.	11. IX. 3 <sup>30</sup> nachm. 10,9 ccm rohe Kuhmilch intravenös. Unruhig, mäßige Dyspnoë. 2. X. 3 <sup>25</sup> nachm. 12,2 ccm rohe Kuhmilch intrav. Keine augen- fällige Reaktion.	9. X. Meerschw., 320 g. 5 ccm inaktiviertes Serum vom Kan. No. 20 intraperitoneal. 10. X. 6 <sup>30</sup> nachm. 1 ccm rohe Kuhmilch intravenös. Schüttelfrost, sonst aber keine anaphylaktischen Symptome. Temperatur vor der Injektion 38,6°, um 6 <sup>45</sup> 38,4°, 6 <sup>50</sup> 38,6°. 11. X. Lebt, gesund.	4. VIII. 6. IX. 11. IX. 2. X. 3 <sup>10</sup> nachm. 2. X. 4 <sup>10</sup> nachm. 7. X.	1,6,3 0,7,2 0,3,1,2,0,8 0,3,3 1,2,4 0,5,2	17 4 4,5 11 12 8

pro kg Körpergewicht, in einem Falle mit 2, in einem anderen mit 3 ccm.

Um entscheiden zu können, ob die Einführung von Kuhmilch in die Blutbahn auf die ebenbeschriebene Weise eine Veränderung der elektrischen Erregbarkeit des Nervensystems mit sich bringt, ist es natürlich nötig, die normalen Werte der elektrischen Erregbarkeit zu kennen. Eine solche Untersuchung ist bisher meines Wissens nicht an Kaninchen angestellt, jedenfalls nicht veröffentlicht worden. Daher wurde an allen Versuchstieren elektrische Prüfung am Tage vor der 1. Milchinjektion angestellt. Wiederholt wurde dann die elektrische Untersuchung nach ungefähr einem Monat oder in den Tagen gleich vor der Reinjektion, ferner eine kurze Weile nach derselben, also während des anaphylaktischen Shocks, und schließlich am 5.—13. Tage nach der Reinjektion oder mit anderen Worten während der Periode, wo nach Friedemanns und Friedbergers Erfahrung die Anaphylaxie auf ihrem Höhepunkte ist.

Nach der letzten elektrischen Prüfung wurden die Kaninchen durch Blutabzapfen aus der Arteria carotis getötet. Ihre Sera wurden danach auf den Gehalt an anaphylaktischem Reaktionskörper auf folgende Weise untersucht: 4—5 ccm von dem Kaninchenserum wurde  $\frac{1}{2}$  Stunde lang bei  $56^{\circ}$  C erhitzt und intraperitoneal einem Meerschweinchen von 300—400 g Gewicht injiziert; 24 Stunden danach wurde 1 ccm rohe Kuhmilch intravenös eingespritzt.

Vier von den Versuchstieren wurden eine etwas längere Zeit am Leben gelassen, noch einmal wurde Kuhmilch injiziert und eine erneute elektrische Untersuchung angestellt, worüber mehr unten.

Wenden wir uns nun einem Studium der Versuchsprotokolle zu, die sich in Tabelle I wiedergegeben finden, so sehen wir zunächst, daß die 20 Tiere die erste Kuhmilchinjektion, 3 ccm pro kg Körpergewicht, ohne Reaktion vertrugen. Bei der zweiten Milchinjektion dagegen, die 30—31 Tage nach der ersten mit im allgemeinen 4 ccm pro kg Körpergewicht, gleichfalls intravenös vorgenommen wurde, wurden alle Tiere (es waren nun 17, nachdem 3 von ihnen interkurrent gestorben waren) mehr oder weniger krank. Fast sofort oder

nach einigen wenigen Minuten wurden sie unruhig, legten sich dann hin und zeigten mehr oder weniger ausgesprochene Dyspnoë; in den schweren Fällen trat auch Krampf, sowie Harn- und Faecesabgang ein. Einige lagen still, keuchend und konnten nicht dazu vermocht werden, sich zu erheben. Eines von den Kaninchen starb unter Krampfsymptomen 15 Minuten nach der Reinjektion. Die Tiere wiesen also deutliche Zeichen von Ueberempfindlichkeit gegen die injizierte Kuhmilch auf; sie befanden sich in einem anaphylaktischen Zustande. Daß es sich wirklich um einen solchen handelte, zeigte übrigens die darauffolgende Serumprüfung, die 7—19 Tage nach der Reinjektion angestellt wurde, und wobei die mit Kaninchensera passiv sensibilisierten Meerschweinchen (siehe Spalte 5) nach intravenöser Injektion von 1 ccm roher Kuhmilch im allgemeinen ein deutliches Bild von anaphylaktischem Shock mit Dyspnoë, Krampf, gestäubten Haaren, Jucken und Temperaturfall darboten. In einem Falle trat der Tod nach 3 Minuten unter typischen anaphylaktischen Symptomen ein.

In der letzten Spalte von Tabelle I finden wir schließlich Angaben über die Stromstärke, ausgedrückt in Milliampère, bei welcher Kathodenschließungs- (K.S.Z.), Anodenschließungs- (A.S.Z.), Anodenöffnungs- (A.Ö.Z.) und Kathodenöffnungs- (K.Ö.Z.) bei den einzelnen Untersuchungsgelegenheiten eintrat. Der Uebersichtlichkeit wegen sind die Mittelwerte der gefundenen Zahlen berechnet und in Tabelle II zusammengestellt worden.

Tabelle II.

Um einen exakten Vergleich zu ermöglichen, sind die Durchschnittszahlen teils von 17, teils von 12 Tieren (letztere in Klammern angegeben) berechnet worden. Von den Kaninchen wurden nur 12 gleich nach der ersten Reinjektion aus dem Grunde untersucht, weil Fehler in der elektrischen Leitung auftraten. Ebenso umfaßte die Gruppe, die am 5.—13. Tage nach der Reinjektion geprüft wurde, nur 12 Tiere.

	Normal	30—31 Tage nach der Sensibilisierung	Gleich nach der Reinjektion	Am 5.—13. Tage nach der Reinjektion
K.S.Z.	1,05 ( 1,13)	0,50 (0,48)	(0,40)	(0,50)
A.S.Z.	2,24 ( 2,55)	1,67 (1,70)	(1,75)	(1,73)
A.Ö.Z.	2,68 ( 3,25)	1,10 (1,12)	(1,07)	(1,03)
K.Ö.Z.	12,61 (12,83)	4,05 (3,98)	(3,45)	(3,34)

Betrachten wir zunächst die elektrischen Erregbarkeitsverhältnisse, wie sie sich am Tage, bevor den Tieren Kuhmilch injiziert wurde, ausnahmen, oder mit anderen Worten die Normalwerte, so finden wir, daß die Kathodenschließungszuckung bei 1,05 (1,13) Milliampère eintritt. Wie aus dem Versuchsprotokoll hervorgeht, liegen die Werte bei der Mehrzahl der Tiere recht nahe diesem Mittelwert. Besonders gilt dies für die älteren Tiere. Es waren deren bei Beginn des Versuchs 14 Stück mit einem Gewicht von ungefähr 2000 g und darüber. Unter diesen befinden sich jedoch 4, die etwas größere Abweichungen aufweisen, nämlich die Kaninchen No. 2 und 4, die Werte bis hinauf zu 2 und 2,2 Milliampère zeigen, und No. 7 und 19, bei denen die Kathodenschließungszuckung schon bei 0,5 und 0,6 Milliampère eintrat. Bei den 6 übrigen Tieren, die jünger waren mit einem Gewicht unter 2000 g, finden wir etwas niedrigere Werte: bei 4 von ihnen liegen die Werte zwischen 1 und 0,5, bei den 2 übrigen geht er bis auf 0,3 herunter. Die Anodenschließungszuckung zeigt sich bei 2,24 (2,55) Milliampère. Die Zahlen, die der Berechnung dieses Wertes zugrunde gelegen, variieren auch nicht besonders; bei den 14 älteren finden wir Zahlen zwischen 1,8 und 3,8, bei den 6 jüngeren zwischen 1 und 1,8. Wenden wir uns dann der Anodenöffnungszuckung zu, so finden wir, daß sie bei 2,68 (3,25) Milliampère eintritt. Derselbe Unterschied macht sich auch hier zwischen älteren und jüngeren Tieren geltend; bei ersteren stellt sich die Zuckung, was die Mehrzahl (12 Stück) betrifft, zwischen 1,8 und 4 Milliampère ein, bei den Kaninchen No. 2 und 4 erst bei 6 bzw. 8 Milliampère. Die 6 jüngeren Kaninchen dagegen zeigen Anodenöffnungszuckung schon zwischen 0,5 und 1,5 Milliampère. Die Zahlen für die Kathodenöffnungszuckung weisen die größten Schwankungen auf; bei den älteren Tieren tritt sie zwischen 10—20 Milliampère, bei den jüngeren zwischen 8 und 16 auf. Wir sehen demnach, daß bei den jüngeren Kaninchen die Zuckung sich etwas früher einstellt als bei den älteren, und dies gilt bei Reizung sowohl mit Kathode wie mit Anode, bei Oeffnung wie bei Schließung des

Stromes. Worauf dies beruhen kann, darauf näher einzugehen habe ich hier keinen Anlaß. Ein regelmäßiges Verhältnis zwischen Alter und Erregbarkeit läßt sich jedoch nicht nachweisen. Es ist wohl auch anzunehmen, daß die großen Variationen bei der Kathodenöffnung teilweise auf der Schwierigkeit beruhen, exakt die geringste Stromstärke abzulesen, bei welcher die Zuckung auftritt. Wir können ferner konstatieren, daß die Reihenfolge, in welcher die verschiedenen Zuckungen sich einstellen, im allgemeinen dieselbe ist wie beim Menschen; zuerst zeigt sich die Kathodenschließungszuckung, dann kommt die beim Anodenschlusse, danach die Anodenöffnungs- und zuletzt die Kathodenöffnungszuckung. Die Zahlenwerte weichen auch nicht in höherem Grade von denjenigen ab, die Mann und Thiemich (15) für das über 8 Wochen alte Kind gefunden haben. Die entsprechenden Zahlen sind nach diesen Forschern 1,41, 2,24, 3,63 und 8,22.

Nachdem wir nun die normalen Werte für die elektrische Erregbarkeit kennen gelernt haben, wollen wir zusehen, wie diese sich während des anaphylaktischen Zustandes verhält. Einen Monat nach der Sensibilisierung, d. h. zu dem Zeitpunkt, wo eine Reinjektion von Kuhmilch anaphylaktische Symptome hervorruft, ist eine recht beträchtliche Steigerung der elektrischen Erregbarkeit eingetreten, oder mit anderen Worten, die zur Hervorrufung der verschiedenen Zuckungen erforderliche Stromstärke liegt nun nicht unbedeutend niedriger als vorher. Die Kathodenschließungszuckung erscheint nun bei 0,50 Milliampère im Durchschnitt anstatt bei 1,05 normalerweise. Der höchste Wert ist nun 0,8, der niedrigste 0,2. Aus dem Versuchsprotokoll geht hervor, daß die Steigerung sich bei allen Tieren findet mit Ausnahme von 2, nämlich den Kaninchen 10 und 14. Diese Tiere haben jedoch normale, niedrige Kathodenschließungszahlen, beide 0,3 Milliampère. Die Anodenschließungszuckung tritt nun durchschnittlich bei 1,67 auf, normal bei 2,24; die Variationen liegen nun zwischen 2,6 und 1,2 Milliampère, vorher zwischen 3,8 und 2,2. Von den 17 Kaninchen, die bei dieser Gelegenheit geprüft wurden, wiesen 12 eine Steigerung der elektrischen Erregbarkeit auf. Von den übrigen 5 steht eins (No. 16) auf

demselben Punkte wie vorher; die übrigen 4 zeigen Anodenschließungswerte, die unbedeutend höher als die Anfangszahlen sind. Zu beachten ist indessen, daß alle 4 Tiere junge Individuen sind mit niederen Normalwerten. Der Anodenöffnungswert ist gleichfalls gesunken, von 2,68 auf 1,10. Die Senkung betrifft 14 Tiere; die übrigen 3, die junge Individuen mit niedrigen Normalwerten sind, sind in demselben Erregbarkeitszustand verblieben, was die Anodenöffnung betrifft. Am stärksten ausgesprochen ist die Steigerung bei der Kathodenöffnung, und zwar durchgehends für alle Tiere; die Werte sind nun gefallen auf 4,05 von 12,61 normal, die Variationen bewegen sich zwischen 8 und 2,7. Interessant ist es auch zu sehen, daß die Reihenfolge des Auftretens der verschiedenen Zuckungen umgedreht ist; die Anodenöffnungszuckung kommt nun vor der Anodenschließungszuckung, also dasselbe Verhältnis, wie es statthat, wenn die elektrische Erregbarkeit beim Kinde gesteigert wird (Mann und Thiemich).

Nachdem ich so eine elektrische Uebererregbarkeit beim Kaninchen einen Monat nach der Sensibilisierung konstatiert hatte, lag es nahe, sich zu denken, daß die Erregbarkeit noch eine weitere Steigerung während des Shocks nach der Milcheinjektion erfahre. Die Tiere wurden geprüft, nachdem sie sich einigermaßen von dem Shock erholt hatten. Bei einigen Tieren konnte nun wirklich eine weitere Steigerung festgestellt werden, bei anderen dagegen fand ich ungefähr dieselben Werte wie bei der vorigen Prüfung. Eine gewisse Differenz, wenn auch klein, gibt sich indessen in den Durchschnittszahlen zu erkennen (siehe Tabelle II), am deutlichsten ausgesprochen wieder bei der Kathodenöffnung. Die Differenzen sind jedoch zu gering, als daß ihnen größere Bedeutung beigemessen werden könnte.

Bei der Methode zur Herbeiführung eines anaphylaktischen Zustandes bei Kaninchen, die hier zur Anwendung gekommen ist, erreicht, wie bereits erwähnt, die Ueberempfindlichkeit ihren Höhepunkt ungefähr 8 Tage nach der zweiten Injektion des sensibilisierenden Stoffes. Wenn man nämlich zu diesem Zeitpunkt eine neue ähnliche Injektion macht, so sterben, nach Friedemanns und Friedbergers Angaben, die Kaninchen im allgemeinen an Anaphylaxie. Es war daher von Interesse,

zu untersuchen, ob vielleicht die Kaninchen eine weitere Steigerung der elektrischen Erregbarkeit nach der zweiten Milchinjektion aufweisen würden. 12 von den Tieren wurden zu diesem Zwecke am 5. bis 13. Tage nach der Reinjektion untersucht. Die Durchschnittswerte der Stromstärke liegen indessen, wie aus Tabelle II zu ersehen ist, andauernd sehr nahe den bei den beiden vorhergehenden Prüfungen erhaltenen, was die Kathodenschließungs-, die Anodenschließungs- und die Anodenöffnungszuckung betrifft. Nur bei der Kathodenöffnung tritt eine weitere Steigerung hervor, von 3,98 bezw. 3,45 Milliampère bei den beiden vorhergehenden Prüfungsgelegenheiten auf 3,34. Wie das Versuchsprotokoll zeigt, betrifft die Steigerung 7 von den 12 Tieren, während die übrigen ungefähr in demselben Erregbarkeitszustand verbleiben. Es ist jedoch in Betracht zu ziehen, daß es sich hierbei um die Kathodenöffnung handelt, und daß es, wie oben betont, schwierig ist, die betreffende Reizschwelle exakt festzustellen.

Wir haben nun die Veränderung der elektrischen Erregbarkeit bis zum 13. Tage nach der zweiten Milchinjektion verfolgt und konstatiert, daß eine Steigerung derselben noch zu dieser Zeit existiert. Nachdem die 12 Tiere, an denen diese Beobachtung gemacht worden war, zwecks der obenerwähnten Serumprüfung getötet worden und eins von den Tieren (No. 11) im anaphylaktischen Shock bei der zweiten Injektion gestorben war, waren noch 4 (No. 17, 18, 19 und 20) übrig. Diese 4 Kaninchen wurden mit dem galvanischen Strom am 20. Tage nach der zweiten Milchinjektion untersucht. Dabei zeigte es sich, daß eine nicht unbedeutende Veränderung in ihrem elektrischen Erregbarkeitszustande eingetreten war, seitdem sie zuletzt, d. h. gleich nach der zweiten Injektion, geprüft worden waren (siehe das Versuchsprotokoll und Tabelle III, die die Mittelwerte für diese 4 Kaninchen während des ganzen Verlaufes der Untersuchung wiedergibt). Am wenigsten verändert ist die Erregbarkeit bei der Kathodenschließung. Bei den Tieren No. 17, 19 und 20 finden sich genau dieselben Werte wieder, bei No. 18 dagegen ist sie von 0,2 Milliampère auf 0,7 gesunken. Bei der Anodenschließung hat durchgehends eine Senkung stattgefunden, und bei der Anodenöffnung ist das gleiche der Fall bei 3 von den 4 Ka-

Tabelle III.

	Normal	30—31 Tage nach der Sen- sibilisierung	Kurz nach der Reinjekt.	Am 20. Tage nach der Reinjekt.	Kurz nach der zweiten Reinjekt.	Am 5. Tage nach der zweiten Reinjektion
K.S.Z.	1,32	0,47	0,32	0,45	1,10	0,50
A.S.Z.	2,87	1,87	1,27	2,20	3,25	1,60
A.Ö.Z.	3,12	1,15	0,85	1,52	2,90	1,05
K.Ö.Z.	12,37	3,72	3,17	9,25	12	6,87

ninchen. Die größte Verschiedenheit tritt jedoch bei der Kathodenöffnung hervor; bei allen Tieren stellt sich die Zuckung bedeutend später als vorher ein. Vergleichen wir die Durchschnittswerte (Tabelle III), so finden wir bei der ersteren Gelegenheit die Zahlen: 0,32, 1,27, 0,85, 3,27 und bei der letzteren bzw. 0,45, 2,50, 1,52 und 9,25. Die elektrische Erregbarkeit ist demnach bei diesen 4 Kaninchen, bei denen sie vorher bedeutend gesteigert gewesen war, wieder gesunken und hat begonnen, sich dem normalen Zustande zu nähern. Interessant ist es, in diesem Zusammenhange sich an die Beobachtung zu erinnern, die Doerr und Russ (16) betreffs des Auftretens und Verschwindens des anaphylaktischen Reaktionskörpers bei allergischen Kaninchen gemacht haben. Sie fanden nämlich, daß er während der folgenden Tage an Menge zunimmt, daß aber am 20. Tage eine beträchtliche Verminderung stattgefunden hat, und daß er am 30. Tage vollständig verschwunden ist. Ich will jedoch in Anbetracht der kleinen Zahl der Tiere aus dieser Analogie nicht den Schluß ziehen, daß ein direkter Zusammenhang zwischen der Menge des anaphylaktischen Reaktionskörpers und der elektrischen Erregbarkeit besteht.

Nachdem so eine Senkung der elektrischen Erregbarkeit am 20. Tage konstatiert war, erhob sich ganz natürlich die Frage, ob eine neue Milchinjektion die elektrische Erregbarkeit wieder in derselben Richtung wie bei den früheren Gelegenheiten verändern würde. Die 4 Kaninchen erhielten daher noch einmal Kuhmilch intravenös, 4 ccm pro kg Körpergewicht unmittelbar nach der erwähnten elektrischen Prüfung. Drei von den Tieren (No. 17, 18 und 20) reagierten dabei



höchst unbedeutend, wenn überhaupt. Nur das Kaninchen No. 19 zeigte eine mäßige Dyspnoë, sowie Harn- und Faecesabgang. Bei der gleich darauf vorgenommenen elektrischen Untersuchung ergab es sich, daß eine weitere, höchst frappante Senkung der elektrischen Erregbarkeit bei allen Tieren stattgefunden hatte, eine Veränderung, die demnach im Laufe von weniger als einer Stunde eingetreten war. Die Mittelwerte liegen nun sehr nahe den normalen (Tabelle III). Welches die Ursache der rasch auftretenden Senkung der elektrischen Erregbarkeit ist, lasse ich bis auf weiteres dahingestellt, doch ist zu beachten, daß bei dieser Gelegenheit keine oder höchst unbedeutende anaphylaktische Symptome bei den Kaninchen hervortraten, was dagegen bei der vorhergehenden Milchinjektion der Fall gewesen war, wo die elektrische Erregbarkeit noch weiter anstieg.

Am 5. Tage nach dieser letzten Milchinjektion wurden die Kaninchen einer erneuten elektrischen Prüfung unterzogen. Eine Steigerung war wieder eingetreten; die Mittelwerte liegen nun recht tief unter den normalen, obwohl die Steigerung, was die Kathodenöffnungszuckung betrifft, nicht so groß ist wie vorher. Die Kaninchen wurden dann im Laufe der nächstfolgenden Tage getötet. Nur bei einem der Tiere (No. 19) konnte indessen nun die Gegenwart eines anaphylaktischen Reaktionskörpers mit Sicherheit im Blute nachgewiesen werden.

\* \* \*

Die obigen Versuche zeigen also, daß eine Einführung von Kuhmilch in die Blutbahn bei Kaninchen eine Veränderung der elektrischen Erregbarkeit der Nerven herbeiführt; während einer gewissen Zeit befinden sie sich in einem Zustande von elektrischer Uebererregbarkeit. Wir können demnach mittelst des galvanischen Stromes eine Abnormität bei dem sensibilisierten Tiere entdecken, das, sofern es sich nicht um ein toxisches Antigen handelt, einige Tage nach der Injektion in einen scheinbar vollkommen normalen Zustand zurückkehrt. So äußert sich Richet (17) neulich hierüber: „Chez les lapins et les cobayes, après injection de sérum, vers le 10<sup>e</sup> et 15<sup>e</sup> jour, l'appétit est revenu,

et les animaux reviennent à leur poids initial, et arrivent même à le dépasser.“

Was ferner die Frage, die uns hier zunächst interessiert, nämlich das Verhältnis zwischen der Spasmophilie und der Anaphylaxie, betrifft, so haben diese Versuche gezeigt, daß während des anaphylaktischen Zustandes (nach Sensibilisierung mit Kuhmilch) dasselbe Symptom vorkommt wie während des spasmophilen, nämlich die elektrische Uebererregbarkeit, die ja eines der wichtigsten Kennzeichen für diese Krankheit ist. Das Ergebnis dieser Untersuchung steht übrigens in einer gewissen Uebereinstimmung mit dem, was wir zuvor von dem klinischen Versuch her wissen. Bei dem Versuchstier gelingt es uns, durch intravenöse Einspritzung von roher Kuhmilch eine elektrische Uebererregbarkeit hervorzurufen; bei dem Säugling ist es möglich, wie das Finkelstein (18) nachgewiesen hat, durch Verminderung und Vermehrung der Kuhmilchnahrung die elektrische Erregbarkeit zu regulieren. Derselbe Forscher hat ferner festzustellen versucht, welche Substanz es ist, die in der Kuhmilch die Veränderung der elektrischen Erregbarkeit bewirkt. Er schreibt darüber: „Wahrscheinlich hat die Störung mit dem Kasein, dem Milchfett und Milchzucker nichts zu tun, denn deren Zufügung zu einer die Erregbarkeit mildernden Diät (Frauenmilch, Mehl) hat keine nachteiligen Folgen. Wohl aber hat die Molke dieselbe erregbarkeitssteigernde Wirkung wie die Kuhmilch, so daß vermutlich ein in ihr gelöster Körper in irgendwelcher Weise beteiligt ist.“ Und weiter: „Bedenkt man, daß die eigentümliche Veränderung der elektrischen Erregbarkeit auf eine Beteiligung der Elektrolyte hinweist, so wird der Gedanke an eine Anomalie des Salzstoffwechsels wahrscheinlich.“

Was nun diese letztere Frage betrifft, so lassen sich auch aus meinen Versuchen keine bestimmten Schlüsse ziehen. Doch weisen sie in eine gewisse Richtung. Wir haben nämlich gesehen, daß die elektrische Erregbarkeit am meisten gesteigert war während der Periode, wo die Kaninchen sich in einem vollausgeprägten Ueberempfindlichkeitszustand befanden. Es liegt daher die Annahme nahe, daß die sensibilisierende Substanz beim Hervorrufen der Veränderung im Nervensystem eine Rolle gespielt hat. Nun nehmen bekannt-

lich die meisten Forscher zurzeit an, daß es nur Proteïnsubstanzen sind, die als Anaphylaktogene wirken können. Indessen finden sich ja Eiweißkörper auch in der Molke, und das klinische Experiment und der Tierversuch brauchen daher nicht in verschiedene Richtungen zu weisen. Im übrigen ist es nicht völlig bewiesen, daß nur Eiweißsubstanzen Anaphylaxie hervorrufen können. Jedenfalls scheint es mir möglich, daß man mittelst des Tierversuches wird entscheiden können, welche Substanz in der Kuhmilch es ist, die bei der Veränderung der elektrischen Erregbarkeit wirksam ist.

### Zusammenfassung.

Führt man rohe Kuhmilch in die Blutbahn von Kaninchen, in einer Dosis von 3 ccm pro kg Körpergewicht, ein, so tritt bei ihnen eine Steigerung der elektrischen Erregbarkeit der motorischen Nerven ein.

Bei den obigen Versuchen zeigte es sich, daß die Erregbarkeit einen Monat nach der Injektion bedeutend gesteigert war. Zu diesem Zeitpunkt wiesen die Kaninchen eine ausgesprochene Ueberempfindlichkeit für eine erneute intravenöse Injektion roher Kuhmilch, 4 ccm pro kg Körpergewicht, auf.

Infolge der Reinjektion trat eine weitere, wenn auch unbedeutende, Steigerung der Erregbarkeit bei der Kathodenöffnung ein, nachweisbar noch am 13. Tage nach derselben.

Am 20. Tage nach der Reinjektion war dagegen die Erregbarkeit wieder gesunken und hatte begonnen, sich dem normalen Zustande zu nähern.

Eine noch einmal wiederholte Injektion von roher Kuhmilch steigerte aufs neue die elektrische Erregbarkeit, obwohl nicht in demselben Grade wie vorher.

### Literaturverzeichnis.

- 1) Finkelstein, H., Lehrbuch der Säuglingskrankheiten, Berlin 1905, p. 244.
- 2) Rosenau and Anderson, Journ. med. research. Vol. 15, 1906.
- 3) Clintock and King, Journ. of infect. Diseases, Vol. 3, 1906.
- 4) Laroche, G., Richet fils, Ch., et Saint-Giron, Fr., Compt. rend. Soc. Biol., T. 70, 1911.
- 5) Bordet, J., Annal. de l'Inst. Pasteur, T. 13, 1899.

- 6) Hamburger, Fr., Wiener klin. Wochenschr., 1901, No. 49.
- 7) Moro, E., Arch. de Méd. des Enf., 1903, p. 398.
- 8) — Münchener med. Wochenschr., 1906, No. 49.
- 9) Bauer, Berliner klin. Wochenschr., 1906, No. 46.
- 10) Besredka, A., Handbuch der Technik und Methodik der Immunitätsforschung, 1. Erg.-Bd., 1911, p. 232.
- 11) Achard, Ch., et Flandin, Ch., Compt. rend. Soc. Biol., T. 71, 1911.
- 12) Escherich, Th., Die Tetanie der Kinder, Wien und Leipzig 1909, p. 44.
- 13) Friedemann, H., Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 2, Heft 5.
- 14) Friedberger, E., ebenda, Bd. 3, Heft 7.
- 15) Mann und Thiemich, zitiert nach Escherich, Die Tetanie der Kinder, p. 47.
- 16) Doerr, R., und Russ, V. K., Centralbl. f. Bakt., Abt. I, Orig., Bd. 59, 1911.
- 17) Richet, Ch., L'anaphylaxie, Paris 1912, p. 29.
- 18) Finkelstein, H., Lehrbuch der Säuglingskrankheiten, Berlin 1905, p. 248.

*Nachdruck verboten.*

[Aus der experimentell-biologischen Abteilung (Prof. H. Sachs) des Königl. Institutes für experimentelle Therapie in Frankfurt a. M. (Direktor: Wirklicher Geheimer Rat Professor P. Ehrlich).]

## **Ueber die Wirkung des Cobragiftes auf die Komplemente.**

### **III. Mitteilung.**

#### **Zugleich ein Beitrag zur Kenntnis der hämolytischen Komplemente.**

Von Dr. H. Ritz, Assistent am Institut.

(Eingegangen bei der Redaktion am 22. Januar 1912.)

In zwei vorangehenden Mitteilungen haben Omorokow<sup>1)</sup>, sowie Sachs und Omorokow<sup>2)</sup> über die Wirkung des Cobragiftes auf die Komplemente berichtet und dabei insbesondere die eigentümliche Tatsache beschrieben, daß Meerschweinchen-serum, welches nach Einwirkung von Cobragift seiner Komplementfunktion beraubt ist, sowohl durch Mittelstück als auch

1) L. Omorokow, diese Zeitschr., Bd. 10, 1911, p. 285.

2) H. Sachs und L. Omorokow, diese Zeitschr., B. 11, 1911.

durch Endstück in seiner Wirkung auf ambozeptorbeladene Blutkörperchen quantitativ restituiert werden kann. Es ist bereits von den Autoren die Möglichkeit in Betracht gezogen worden, daß diese eigentümliche Art der Komplementinaktivierung, welcher überdies eine allgemeinere Bedeutung zukommen scheint, durch die Annahme eines dritten Faktors bei der Komplementwirkung außer den bereits als Mittelstück und Endstück bezeichneten Komponenten eine Erklärung finden könnte. Die Untersuchungen, über die im folgenden berichtet werden soll, schließen sich hier an, und wenn sie auch vorläufig nur mit Vorbehalt im Sinne der diskutierten Annahme verwertet werden dürfen, so war dieselbe jedenfalls für Fragestellung und Versuchsanordnung maßgebend.

Was die Methodik anlangt, so wurde die Inaktivierung des Komplements durch Cobragift stets in der von Omorokow beschriebenen Weise derart vorgenommen, daß 0,5 ccm Meerschweinchenserum mit 0,2 ccm  $\frac{1}{8}$ -proz. Cobragiftlösung  $1\frac{1}{4}$  Stunde bei  $37^{\circ}$  digeriert wurden. Die Titrierung des derart behandelten Komplements erfolgte allein resp. mit Zusatz von anderen Bestandteilen möglichst rasch. Jedoch konnte bei dem immerhin erforderlichen Zeitaufwand ein Fortschreiten der Cobragiftwirkung durch das nach  $1\frac{1}{4}$ -stündigem Digerieren, wenn möglich, vorgenommene Verdünnen der Mischung auf einen Gehalt von 10 Proz. Meerschweinchenserum entsprechend den Erfahrungen von Omorokow vermieden werden. Als Blutkörperchen wurde Hammelblut in 7–8-proz. serumfreier Suspension verwandt, das mit einem vom Kaninchen stammenden Ambozeptor, entsprechend ca. 12 Ambozeptoreinheiten, sensibilisiert war. Die Ablesung der Resultate geschah nach 2-stündigem Verweilen im Thermostaten, eventuell nach Aufbewahrung im Eischrank bis zum folgenden Tage.

In den folgenden Tabellen bedeuten: k = komplette, fk = fast komplette, st = starke, m = mäßige, w = wenig, Sp = Spur, Spch = Spürchen, 0 = keine Hämolyse.

Bei der Zerlegung von Meerschweinchenserum in die Albumin- und Globulinfraktion wurde stets in der Weise verfahren, daß ein Teil Meerschweinchenserum mit 4 Teilen destillierten Wassers verdünnt wurde. Nach 5 Minuten langem Einleiten von Kohlensäure wurde zentrifugiert. Die Sedimentteile wurden nach Waschen mit destilliertem Wasser auf das doppelte Volumen der ursprünglich verwandten Serummenge mit  $H_2O$  aufgefüllt, der Abgußteil kam direkt zur Verwendung, so daß er 5-fach verdünntem Meerschweinchenserum entsprach. Die derart gewonnenen Komponenten wurden stets einzeln und auf die durch ihr Zusammenwirken bedingte Restitution geprüft. Die Mengen, welche in den folgenden Tabellen angegeben sind, beziehen sich auf unverdünntes Meerschweinchenserum.

Um zunächst die Tatsache, daß Mittelstück und Endstück nach der Einwirkung des Cobragiftes im Meerschweinchen-serum zugleich vorhanden sind, zu erhärten, wurde untersucht, ob in der digerierten Mischung von Cobragift und Meerschweinchen-serum mittels der Kohlensäuremethode noch beide Komponenten sich voneinander trennen lassen. Zu diesem Zweck wurde folgendermaßen verfahren:

Mit Cobragift behandeltes Meerschweinchen-serum wurde nach Zufügen von destilliertem Wasser (1 ccm Meerschweinchen-serum ad 5,0 ccm) durch Einleiten von Kohlensäure getrennt. Gleichzeitig wurden aus normalem Meerschweinchen-serum die beiden Komponenten gewonnen.

Es wurden sodann absteigende Mengen:

I. des mit Cobragift behandelten Meerschweinchen-serums:

- a) allein,
- b) unter Zusatz von 0,05 ccm normalen Abgusses,
- c) unter Zusatz von 0,1 ccm normalen Sedimentes;

II. des aus Cobra-Meerschweinchen-serum gewonnenen Abgusses:

- a) unter Zusatz von 0,1 ccm normalen Sedimentes,
- b) unter Zusatz von 0,1 ccm Cobrasedimentes;

III. des aus Cobra-Meerschweinchen-serum gewonnenen Sedimentes:

- a) unter Zusatz von 0,05 ccm normalen Abgusses;
- b) unter Zusatz von 0,05 ccm Cobraabgusses;

mit je 1 ccm sensibilisierten Hammelblutes digeriert. Gesamtvolumen 2,25 ccm. Das Ergebnis zeigt Tabelle I.

Tabelle I.

Ab- steigende Mengen Cobra- Meerschw- Serums resp. seiner Kom- ponenten ccm	Hämolyse von sensibilisiertem Hammelblut durch absteigende Mengen						
	I. des mit Cobragift be- handelten Meerschweinchen- serums			der aus Cobra-Meerschweinchen- serum gewonnenen Komponenten			
				II. Abguß		III. Sediment	
	a) allein	b) + 0,05 normaler Abguß	c) + 0,1 normales Sediment	a) + 0,1 normales Sediment	b) + 0,1 Cobra- sediment	a) + 0,05 normaler Abguß	b) + 0,05 Cobra- abguß
0,1	0	fk	k	k	0	k	0
0,05	0	st	k	k	0	k	0
0,025	0	st	k	k	0	k	0
0,015	0	st	k	k	0	k	0
0,01	0	st	k	k	0	st	0
0,005	0	st	st	m	0	st	0
0,0025	0	m	w	w	0	w	0
0	0	Spch	0	0	0	Spch	0

Aus der Tabelle ergibt sich, daß in der Tat aus dem mit Cobragift behandelten Meerschweinchen-

serum die beiden Komponenten in wirksamer Form isoliert werden können. Es zeigt sich, daß der aus Cobra-Meerschweinchenserum gewonnene Abguß durch normales Sediment, aber nicht durch das Sediment des Cobra-Meerschweinchenserums aktiviert wird, und umgekehrt verhält sich das Sediment des Cobra-Meerschweinchenserums. Es ist also aus dem inaktiven Cobra-Meerschweinchenserum durch Kohlensäurefällung sowohl Mittelstück als auch Endstück isoliert gewonnen worden, die in gegenseitiger Kombination unwirksam sind, während sie im Verein mit der korrespondierenden Komponente des normalen Serums eine sehr erhebliche Wirkung entfalten<sup>1)</sup>. Wenn man also zur Erklärung der Wirkung des Cobragiftes auf das Komplement im Sinne einer Larvierung beider Komponenten annehmen wollte, daß etwa Mittelstück und Endstück irgendwie zu einer inerten Verbindung vereinigt sind, so muß man zum mindesten schließen, daß die Trennung der beiden Komponenten bereits durch die übliche Ausfällung der Globuline gelingt.

Folgt man nun der Annahme, daß ein dritter Faktor für die Komplementwirkung noch in Betracht kommt, so würde sich ergeben, daß dieser sowohl in dem mit Cobragift behandelten Meerschweinchenserum, als auch in den aus ihm erhaltenen Globulin- und Albumintteilen fehlt, dagegen sowohl im Globulin-, als auch im Albuminteil des normalen, nach der von uns geübten Weise getrennten Meerschweinchenserums vorhanden ist. Um dieser Frage weiter nachzugehen, habe ich nun nach Mitteln gesucht, welche Meerschweinchenserum

1) Eines Hinweises bedarf vielleicht die Tatsache, daß bei der Aktivierung des aus Cobra-Meerschweinchenserum gewonnenen Sedimentes durch normalen Abguß stärkere hämolytische Grade erzielt wurden als bei der entsprechenden Aktivierung des gesamten Cobra-Meerschweinchenserums. Es sei in dieser Hinsicht daran erinnert, daß die Aktivierung des durch Cobragift inaktivierten Serums durch Endstück, wie sich das bereits aus den Untersuchungen von Omorokow ergeben hatte, nicht immer mit solcher Prägnanz erfolgt als diejenige durch Mittelstück. Es bilden, wie es die Versuche Omorokows wahrscheinlich erscheinen lassen, dabei antagonistische Einflüsse eine störende Interferenz, und man wird vielleicht nicht fehlgehen in der Annahme, daß diese unter Umständen bei Verwendung des isolierten Globulinteiles weniger markant in Erscheinung treten.

seiner Komplementwirkung berauben und auch nicht mehr die eine oder die andere der beiden bekannten Komponenten nachweisbar erscheinen lassen, aber dennoch das mit Cobra-gift behandelte Meerschweinchenserum zu aktivieren imstande sind. Es lag hierbei nahe durch Erhitzen inaktiviertes Meerschweinchenserum zu benutzen, da ja bekannt ist, daß das in üblicher Weise inaktivierte Meerschweinchenserum sich nicht ohne weiteres durch Mittelstück- oder Endstückzusatz aktivieren läßt. Allerdings geben Mutermilch<sup>1)</sup> und Marks<sup>2)</sup> auf Grund neuerer Untersuchungen, von denen ich erst während der Ausführung meiner Versuche Kenntnis erhielt, an, daß durch geeignetes Erhitzen und besonders durch eine begrenzte Dauer desselben Meerschweinchenserum derart inaktiviert werden kann, daß insbesondere die Mittelstückkomponente noch nachweisbar ist. Es liegt nicht im Rahmen dieser Arbeit, auf diese Befunde der Autoren näher einzugehen, und ich verfüge auch vorläufig nicht über Erfahrungen in dieser Richtung. Für die vorliegenden Zwecke erschien es zunächst hinreichend, das zur Benutzung gelangende thermoinaktivierte Meerschweinchenserum daraufhin zu kontrollieren, ob eine Restitution seiner Wirkung durch Mittelstück- oder Endstückzusatz erfolgt. Derartige Kontrollen wurden in jedem Versuch ausgeführt, und es ergab sich regelmäßig, daß  $\frac{1}{2}$ -ständiges Erhitzen auf  $54^{\circ}$  genügte, um eine hämolytische Wirkung auch nach Endstück- oder Mittelstückzusatz nicht in Erscheinung treten zu lassen. Als Beispiel sei folgender Versuch angeführt.

Absteigende Mengen:

- I.  $\frac{1}{2}$  Stunde auf  $52^{\circ}$  erhitzten Meerschweinchenserums;
- II.  $\frac{1}{2}$  Stunde auf  $54^{\circ}$  erhitzten Meerschweinchenserums wurden:
  - a) allein,
  - b) unter Zusatz von je 0,04 ccm Abguß (Albumin aus normalem Meerschweinchenserum),
  - c) unter Zusatz von je 0,1 ccm Sediment (Globulin aus normalem Meerschweinchenserum);

mit je 1 ccm sensibilisierten Hammelblutes digeriert.

Das Ergebnis zeigt Tabelle II.

---

1) St. Mutermilch, Compt. rend. Soc. Biol., T. 70, 1911, No. 14.  
 2) H. K. Marks, diese Zeitschr., Bd. 11, 1911, p. 18.



Tabelle II.

Mengen des Meer- schweinchen- serums ccm	Hämolyse von 1 ccm sensibilisierten Hammelblutes					
	I. durch 52°-Meerschweinchenserum			II. durch 54°-Meerschweinchenserum		
	a) allein	b) + Ab- guß	c) + Sedi- ment	a) allein	b) + Ab- guß	c) + Sedi- ment
0,1	Sp	k	w	0	0	0
0,05	Spch	fk	Spch	0	0	0
0,025	Spch	st	Spch	0	0	0
0,015	Spch	m	0	0	0	0
0,01	0	w	0	0	0	0
0,005	0	Sp	0	0	0	0
0,0025	0	Spch	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0

Wie die Tabelle zeigt, gelingt bei Erhitzen des Meer-schweinchenserums auf 52° noch eine gewisse Restitution, die besonders bei Endstückzusatz entsprechend den Angaben von Mutermilch und Marks ziemlich stark in Erscheinung tritt. Durch das  $\frac{1}{2}$ -stündige Erhitzen auf 54° ist jedoch mit dem gänzlichen Erlöschen der Kom-plementfunktion auch die Möglichkeit einer Re-stitution durch Mittelstück- oder Endstückzusatz aufgehoben<sup>1)</sup>. Obwohl also das durch Erhitzen auf 54° inaktivierte Komplement auch frei von jeder der beiden Komponenten erscheint, erwies es sich befähigt, das durch Cobragiftwirkung inaktivierte Meerschweinchenserum zu „akti-vieren“<sup>2)</sup>.

In dem folgenden Versuchsbeispiel, das zum Beleg hierfür angeführt sei, wurden auch durch Erhitzen auf 56° inaktivierte Serumproben in den Bereich der Untersuchung gezogen.

1) Besondere Versuche, in denen das auf 54° erhitzte Meerschweinchenserum zunächst mit den sensibilisierten Blutkörperchen digeriert wurde und erst später Endstückzusatz erfolgte, ließen die Vermutung, daß derart in-aktiviertes Serum etwa als Mittelstück im Sinne der von Brand be-schriebenen NaCl-Modifikation wirken könnte, als irrig erscheinen.

2) Auch in den folgenden Versuchen wurde die Restituierbarkeit des thermoinaktivierten Serums durch Mittelstück oder Endstück stets kon-trolliert. Da das Ergebnis beim Erhitzen auf 54° jedoch immer mit dem in Tabelle II angegebenen übereinstimmte, darf wohl von der Wiedergabe dieser Kontrollversuche abgesehen werden.

Absteigende Mengen:

I. mit Cobragift behandelten Meerschweinchenserums;

II. nativen Meerschweinchenserums (Kontrollen) wurden:

a) allein,

b) unter Zusatz von je 0,04 ccm CO<sub>2</sub>-Abguß,

c) unter Zusatz von je 0,1 ccm CO<sub>2</sub>-Sediment,

d) unter Zusatz von je 0,1 ccm 54°-Meerschweinchenserums,

e) unter Zusatz von je 0,1 ccm 56°-Meerschweinchenserums<sup>1)</sup>;

mit je 1 ccm sensibilisierten Hammelblutes digeriert.

Das Ergebnis zeigt Tabelle III.

Tabelle III.

Mengen von I. und II.  ccm	Hämolyse von 1 ccm sensibilisierten Hammelblutes durch									
	I. Cobra-Meersch.-Serum					II. Normal-Meersch.-Serum				
	a) allein	b) + Ab- guß	c) + Sedi- ment	d) + 54° M.-S.	e) + 56° M.-S.	a) allein	b) + Ab- guß	c) + Sedi- ment	d) + 54° M.-S.	e) + 56° M.-S.
0,1	Spch	w	k	k	Sp	k	k	k	k	k
0,05	0	m	k	k	Sp	k	k	k	k	k
0,025	0	st	k	k	Spch	m	k	m	fk	st
0,015	0	st	m	fk	Spch	w	k	w	m	m
0,01	0	fk	m	m	Spch	Sp	fk	Sp	Sp	Sp
0,005	0	w	Sp	Sp	Spch	Spch	st	Spch	Spch	Spch
0,0025	0	Sp	Spch	Spch	Spch	Spch	Sp	0	Spch	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Wie die Tabelle zeigt, wird also durch das durch Erhitzen auf 54° inaktivierte Meerschweinchenserum, ebenso wie durch die als Mittelstück und Endstück bezeichneten Komponenten eine Restitution des mit Cobragift behandelten Komplementes herbeigeführt, die man auf Grund eines Vergleiches der Kolumnen I und II der Tabelle als annähernd quantitativ ansprechen kann. Es sei gleich im Anschluß an diese Feststellung darauf hingewiesen, daß die Thermostabilität der hier interferierenden Funktion nur eine relative zu sein scheint. Denn das auf 56° erhitzte Meerschweinchenserum läßt meist, wie es auch in Tabelle III der Fall ist, nur noch eine Andeutung des dem auf 54° erhitzten Serum zukommenden Vermögens erkennen. Wenn man auch an die Möglichkeit denken kann,

1) Die Hitzeeinwirkung dauerte stets  $\frac{1}{2}$  Stunde.

daß bei stärkerem Wärmeeinfluß antagonistische Momente in Erscheinung treten, welche störend interferieren, so ist praktisch jedenfalls die Tatsache von Bedeutung, daß die im inaktivierten Serum vorhandene und die aktivierende Wirkung des mit Cobragift behandelten Meerschweinchenserums vermittelnde Funktion bereits durch geringe Temperaturerhöhung dem Nachweise entgehen kann.

Berücksichtigt man nun den Umstand, daß das auf 54° erhitzte Meerschweinchenserum Mittelstück oder Endstück nicht in nachweisbarer Form enthält, dagegen imstande ist, im Verein mit dem durch Cobragift behandelten Serum aktivierend zu wirken, letzteres aber augenscheinlich sowohl über Mittelstück als auch über Endstück verfügt, ohne die Komplementfunktion ausüben zu können, so gewinnt man in der Tat den Eindruck, als ob 3 verschiedene Faktoren zur Komplettierung erforderlich sind. Folgt man dieser bereits oben in Erwägung gezogenen Annahme, so erscheint offenbar der Mechanismus der Inaktivierung durch Cobragift und derjenige der Inaktivierung durch Erhitzen nicht als wesensgleich. Bei ersterem Vorgang kann man die Ursache der Unwirksamkeit in einer Inaktivierung des thermostabilen Prinzips vermuten, während beim Erhitzen auf 54° gerade Mittelstück und Endstück ihre Funktion ohne Schädigung der stabilen Komponente einbüßen würden.

Tatsächlich stimmen nun eine Reihe weiterer Erfahrungen mit der hier erörterten Hypothese überein. Wenn nämlich das durch Cobragift inaktivierte Meerschweinchenserum, das im folgenden kurz als „Cobraserum“ bezeichnet sei, Mittelstück und Endstück enthält, die Aktivierung desselben durch die aus normalem Serum gewonnenen Komponenten aber nicht durch deren Gehalt an Mittelstück oder Endstück, sondern durch einen in beiden Fraktionen enthaltenen stabilen Faktor bedingt ist, so muß die Cobraserum aktivierende Funktion der durch CO<sub>2</sub>-Trennung erhaltenen Komponenten des Normalserums gleichfalls eine gewisse Thermostabilität aufweisen. Daß dem so ist, zeigt folgendes Versuchsbeispiel.

Meerschweinchenserum wurde auf übliche Weise mittels CO<sub>2</sub> in die beiden Fraktionen (Sediment und Abguß) zerlegt. Ein Teil der beiden Fraktionen wurde  $\frac{1}{2}$  Stunde lang auf 54° erwärmt.

Absteigende Mengen Cobraserums wurden

- a) allein,
- b) unter Zusatz von je 0,05 ccm Abguß,
- c) unter Zusatz von je 0,05 ccm 54°-Abguß,
- d) unter Zusatz von je 0,1 ccm Sediment,
- e) unter Zusatz von je 0,1 ccm 54°-Sediment

mit je 1 ccm sensibilisierten Hammelblutes digeriert.

Das Ergebnis zeigt Tabelle IV.

Tabelle IV.

Mengen des Cobra- Meersch.- Serums ccm	Hämolyse von sensibilisiertem Hammelblut durch Cobra- Meerschweinchenserum				
	a) allein	b) + Abguß	c) + 54°-Abguß	d) + Sediment	e) + 54°-Sedim.
0,1	0	st	m	k	k
0,05	0	„	fk	k	k
0,025	0	„	k	k	k
0,015	0	fk	fk	k	k
0,01	0	k	st	k	k
0,005	0	st	m	k	k
0,0025	0	m	w	m	m
0	0	Spch	0	0	0

Aus der Tabelle ergibt sich, daß die Restitution des Cobraserums nicht nur durch die frischen, sondern auch durch die auf 54° erhitzten Kohlensäure-Fractionen des normalen Meerschweinchenserums gelingt. Die aktivierende Wirkung des erhitzten Sedimentteiles ist sogar im vorliegenden Versuch quantitativ erhalten. Dagegen ist nach dem Erhitzen des Abgusses eine mäßige Abnahme der restituierenden Funktion vorhanden. Eine mehr oder weniger starke Abschwächung durch das Erhitzen kann übrigens hier von vornherein nicht überraschen. Denn wenn man nach früheren Erfahrungen annimmt [Sachs und Bolkowska<sup>1)</sup>, Gengou<sup>2)</sup>, Sachs und Omorokow (l. c.)], daß die Komplementwirkung durch Mittelstück und Endstück verstärkt werden kann, so ist nur zu erwarten, daß nach dem Erhitzen, durch welches Mittelstück- und Endstückwirkung aufgehoben werden und das

1) H. Sachs und G. Bolkowska, diese Zeitschr., Bd. 7, 1910, p. 778.

2) O. Gengou, diese Zeitschr., Bd. 11, 1911, p. 143.

stabile Prinzip gewissermaßen isoliert wird, auch eine Abnahme der Restitutionskraft bemerkbar ist. Ueberdies kann auch eine geringgradige Abschwächung des stabilen Prinzips beim Erhitzen interferieren. Daß nun tatsächlich durch das Erwärmen der beiden CO<sub>2</sub>-Komponenten auf 54° Mittelstück- und Endstückfunktion aufgehoben oder auf ein Minimum reduziert werden, dafür sei folgendes Versuchsbeispiel als Beleg angeführt.

**Absteigende Mengen**

I. nativen CO<sub>2</sub>-Sediments,

II. 54°-CO<sub>2</sub>-Sediments werden unter Zusatz von

a) 0,05 ccm CO<sub>2</sub>-Abguß

b) 0,05 ccm Cobra-Meerschweinchenserums

mit je 1 ccm sensibilisierten Hammelblutes digeriert.

Ebenso werden absteigende Mengen

III. nativen CO<sub>2</sub>-Abgusses,

IV. 54°-CO<sub>2</sub>-Abgusses unter Zusatz von

a) 0,1 ccm CO<sub>2</sub>-Sediments,

b) 0,05 ccm Cobra-Meerschweinchenserums

mit je 1 ccm sensibilisierten Hammelblutes digeriert.

Das Ergebnis zeigt Tabelle V.

Tabelle V.

Mengen von Sedi- ment resp. Abguß ccm	Hämolyse von 1 ccm sensibilisiertem Hammelblut durch							
	I natives Sediment		II 54°-Sediment		III nativen Abguß		IV 54°-Abguß	
	a) + Abguß	b) + Cobra- M.-Ser.	a) + Abguß	b) + Cobra- M.-S.	a) + Sedi- ment	b) + Cobra- M.-Ser.	a) + Sedi- ment	b) + Cobra- M.-Ser.
0,1	k	k	w	k	k	k	Spch	k
0,05	k	k	Sp	k	k	fk	Spch	fk
0,025	k	k	Spch	k	m	w	0	w
0,015	k	k	„	fk	m	Sp	0	Sp
0,01	fk	fk	„	st	w	Spch	0	Spch
0,005	fk	w	„	w	Spch	Spch	0	Spch
0,0025	m	Sp	„	Sp	0	0	0	0
0	Spch	0	„	0	0	0	0	0

Wenn man sich auch jeder präzisierten Schlußfolgerung enthalten will, so demonstriert Tabelle V jedenfalls eine weitgehende Unabhängigkeit der den beiden aus Meerschweinchenserum durch Kohlensäure-trennung erhaltenen Komponenten zukommenden Funktionen einerseits mit der entsprechen-

den Komponente, andererseits mit Cobra-Meerschweinchenserum als Komplement zu wirken. Das Ergebnis steht daher mit der Hypothese, daß außer Mittelstück und Endstück noch ein drittes stabileres Agens bei der Komplementwirkung interferiert, in gutem Einklang. Gleichzeitig zeigt die Tabelle, daß diese stabile Komponente bei dem von mir geübten Modus der  $\text{CO}_2$ -Spaltung in größerer Menge im Globulin-Sediment vorhanden ist, ein Verhalten, das übrigens die Regel darstellte <sup>1)</sup>.

Immerhin war aber bei der Kohlensäuretrennung im Abguß meist eine hinreichende Menge der dritten Komponente enthalten, um bei einem genügenden Ueberschuß aktivierend zu wirken. Auch bei der Spaltung des auf  $54^\circ$  erhitzten Meerschweinchensersums durch Einleiten von Kohlensäure ergaben sich ungefähr die gleichen Verhältnisse.

**Absteigende Mengen**

- a) auf  $54^\circ$  erhitzten Meerschweinchensersums,
- b) des  $\text{CO}_2$ -Sediments aus  $54^\circ$ -Serum,
- c) des  $\text{CO}_2$ -Abgusses aus  $54^\circ$ -Serum

wurden mit je 1 ccm sensibilisierten Hammelblutes unter Zusatz von je 0,1 ccm Cobra-Meerschweinchenserum digeriert.

Das Ergebnis ist in Tabelle VI notiert.

Tabelle VI.

Mengen des $54^\circ$ - Serums resp. sei- ner Fraktionen ccm	Hämolyse von 1 ccm sensibilisierten Hammelblutes durch 0,1 ccm Cobraserum + absteigende Mengen		
	a) $54^\circ$ -Serum	b) Sediment aus $54^\circ$ -Serum	c) Abguß aus $54^\circ$ -Serum
0,1	k	k	m
0,05	k	k	w
0,025	k	st	Sp
0,015	st	w	Spch
0,01	w	w	Spch
0,005	Sp	Sp	0
0,0025	Spch	Spch	0
0	0	0	0

1) Es dürfte sich hieraus auch die bereits von Sachs und Omorokow beobachtete und von mir bestätigte Tatsache erklären, daß bei der Restitution des Cobraserums durch Abguß nicht selten Hemmungserscheinungen interferieren, die bei Zusatz von Sediment nicht wahrnehmbar sind. Vielleicht sind dieselben zum Teil auch der Ausdruck einer noch fortschreitenden Cobragiftwirkung.

Der in Tabelle VI wiedergegebene Versuch läßt gleichfalls ein vorwiegendes Adhärieren des stabilen Prinzips an der Globulinfraktion erkennen. Die ungleichmäßige Verteilung ist vielleicht noch ausgesprochener als bei der Trennung des aktiven Serums. Wenn ich auch vorläufig nicht über hinreichende Erfahrungen für einen sicheren Schluß verfüge, so dürften die mitgeteilten Befunde doch darauf hindeuten, daß die stabile Komponente wesentlich den Globulinen anhaftet<sup>1)</sup>.

Ganz anders mußten sich nun die Verhältnisse gestalten, wenn das im Verein mit 54°-Serum aktivierend wirkende Cobraserum mittels CO<sub>2</sub> fraktioniert wurde. Denn wenn die Annahme richtig ist, daß im Cobraserum Mittelstück und Endstück vorhanden sind, aber gerade dasjenige Agens, dem das 54°-Serum seine Funktion verdankt, fehlt, so war zu fordern, daß jede der beiden aus Cobraserum durch Einleiten von Kohlensäure gewonnenen Fraktionen sich auch im Verein mit 54°-Serum unwirksam erwies. Dürfen sie doch nach unserer Prämisse nur eine der beiden Komponenten, einerseits Mittelstück, andererseits Endstück enthalten, so daß auch nach Zusatz des 54°-Serums ein für die Komplementwirkung integrierender Bestandteil fehlt. Daß man auch das Cobraserum in üblicher Weise in Mittelstück und Endstück zerlegen kann, hat sich bereits aus dem in Tabelle I mitgeteilten Versuch ergeben, und daß das im 54°-Serum enthaltene Prinzip weder

---

1) Es sei dahingestellt, inwieweit dieser Umstand etwa zur Erklärung der von Braun (Biochemische Zeitschr., Bd. 31, 1911, p. 68), Sachs und Omorokow (l. c.) festgestellten Tatsache dienen kann, daß nach Digestieren von Cobragift und Meerschweinchenserum die durch Cobragift veranlaßte hämolytische Wirkung wesentlich nur durch Zusatz der Globulinfraktion restituiert werden kann. Es wäre immerhin möglich, daß die im Albuminteil enthaltene relativ geringe Menge des stabilen Prinzips zur Aktivierung bei der einfachen Kombination von Cobragift und Meerschweinchenserum nicht ausreicht, während sie bei der Interferenz der Immunambozeptoren genügt. Allerdings habe ich auch bei Zusatz von 54°-Meerschweinchenserum zum Cobraserum eine Restitution der Wirkung gegenüber nativen Blutkörperchen nicht oder nur in sehr geringem Grade eintreten sehen, so daß man vorläufig zur Erklärung des Verhaltens ohne weitere Hilfshypothesen schwerlich auskommen kann.

das derart isolierte Mittelstück, noch das entsprechende Endstück zu aktivieren vermag, zeigt das folgende Versuchsbeispiel.

**Absteigende Mengen**

- a) Cobra-Meerschweinchenserums,
- b) CO<sub>2</sub>-Sedimentes aus Cobraserum,
- c) CO<sub>2</sub>-Abguß aus Cobraserum

werden mit je 1 ccm sensibilisierten Hammelblutes unter Zusatz von je 0,1 ccm auf 54° erhitzten Meerschweinchenserums digeriert.

Die eingetretene Hämolyse ergibt sich aus Tabelle VII.

Tabelle VII.

Mengen des Cobraserums resp. seiner Komponenten ccm	Hämolyse von 1 ccm sensibilisierten Hammelblutes durch 0,1 ccm 54°-Meersch.-Serum + absteigende Mengen von		
	a) Cobraserum	b) Sediment aus Cobraserum	c) Abguß aus Cobraserum
0,1	k	Spch	m
0,05	k	Spch	w
0,025	k	0	w
0,015	k	0	Sp
0,01	k	0	Spch
0,005	m	0	0
0,0025	Sp	0	0
0	0	0	0

Wie die Tabelle zeigt, gelingt es in der Tat, das Cobraserum durch CO<sub>2</sub>-Fällung in zwei Fraktionen zu zerlegen, welche beide im Gegensatz zu dem Verhalten des nativen Cobraserums durch 54°-Serum nicht aktiviert werden. Wenn in dem vorstehenden Versuch durch die Kombination von 54°-Serum mit dem Abguß aus Cobraserum eine partielle hämolytische Wirkung veranlaßt wird, so ist zu berücksichtigen, daß eben die Trennung von Mittelstück und Endstück oft nicht vollständig gelingt. Offenbar sind im Abgußteil noch geringe Mengen des Mittelstückes zurückgeblieben, die für eine schwache Komplementwirkung hinreichen. Zusammengefaßt entspricht also das bisher behandelte Material der Annahme, daß für die Komplementwirkung außer Mittelstück und Endstück noch



ein drittes stabiles Prinzip erforderlich ist, resp. daß die seither als Mittelstück und Endstück bezeichneten Globulin- resp. Albuminfraktionen ihrerseits komplexer Zusammensetzung sind und außer Mittelstück resp. Endstück noch eine dritte Komponente (und zwar vorwiegend der Globulinanteil) enthalten.

Durch die Zerlegung des Cobraserums mittels  $\text{CO}_2$  gelingt es, Mittelstück und Endstück gewissermaßen isoliert zu erhalten, und wenn man ferner das  $54^\circ$ -Serum als frei von Mittelstück und Endstück betrachten kann, so ergeben sich drei Faktoren:

- a) das  $\text{CO}_2$ -Sediment aus Cobraserum,
- b) der  $\text{CO}_2$ -Abguß aus Cobraserum,
- c) das  $54^\circ$ -Serum,

die einzeln oder zu zweien kombiniert unwirksam sein, dagegen in Gemeinschaft die Komplementfunktion ergeben müssen. Daß dem so ist, zeigen bis zu einem gewissen Grade bereits die vorangehenden Versuche. Man kann sich aber auch durch eine besonders darauf gerichtete Versuchsanordnung hiervon überzeugen.

Es wurden folgende Gemische angesetzt:

- a) 0,5 Sediment aus Cobraserum + 0,5 Abguß aus Cobraserum;
- b) 0,5 Sediment aus Cobraserum + 1,0 ccm  $54^\circ$ -Serum;
- c) 0,5 Abguß aus Cobraserum + 1,0 ccm  $54^\circ$ -Serum;
- d) 0,5 Sediment aus Cobraserum + 1,0 ccm  $54^\circ$ -Serum + 0,5 ccm Abguß aus Cobraserum;
- e) 0,5 Sediment aus Cobraserum + 0,5 ccm  $54^\circ$ -Serum;
- f) 0,5 Abguß aus Cobraserum + 0,5 ccm  $54^\circ$ -Serum;
- g) 0,5 Sediment aus Cobraserum + 0,5 ccm  $54^\circ$ -Serum + 0,5 ccm Abguß aus Cobraserum;
- h) 0,5 Sediment aus Normalserum + 0,5 Abguß aus Normalserum;
- i) 0,5 nativen Meerschweinchenserums.

Das Volumen jeden Gemisches wurde durch Auffüllen mit 0,85-proz. NaCl-Lösung auf 5 ccm gebracht (entsprechend 10-fach verdünntem Meerschweinchenserum).

Die nach Digerieren absteigender Mengen der Gemische mit sensibilisiertem Blute eintretende Hämolyse ist aus Tabelle VIII ersichtlich.

Tabelle VIII.

Mengen der Gemische ccm	Hämolyse von 1 ccm sensibilisierten Hammelblutes durch absteigende Mengen der Gemische								
	a	b	c	d	e	f	g	h	i
1,0	0	0	w	k	0	Spch	k	k	k
0,5	0	0	Sp	k	0	Spch	fk	k	k
0,25	0	0	Spch	fk	0	Spch	m	fk	k
0,15	0	0	Spch	m	0	0	w	m	fk
0,1	0	0	0	w	0	0	Sp	w	fk
0,05	0	0	0	Spch	0	0	Spch	Sp	m
0,025	0	0	0	Spch	0	0	0	Spch	Sp
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Aus der Tabelle ergibt sich ganz ähnlich, wie dies zuerst Ferrata<sup>1)</sup> für die durch Dialyse aus normalem Meer-schweinchenserum gewonnenen zwei Komponenten gezeigt hatte, eine Restitution der Komplementfunktion durch das Zusammenwirken dreier Fraktionen (Kolumne d und g der Tabelle), von denen jede einzeln oder im Verein mit einer anderen (Kolumnen a—c, e und f der Tabelle) nur sehr geringe oder gar keine Wirkung ausüben. Allerdings ist die Wiederherstellung der Komplementwirkung, wie ein Vergleich der Kolumnen d und g der Tabelle mit Kolumne i zeigt, keineswegs quantitativ. Es dürfte aber eine vollständige Wiederherstellung der komplettierenden Kraft von vornherein kaum erwartet werden können. Denn mit den verschiedenen Manipulationen, welche zur Herstellung der drei Komponenten dienen, ist offenbar Gelegenheit zu einer mehr oder weniger großen Abschwächung gegeben. So gelingt es bereits nicht immer bei der Kombination der durch Kohlensäurefällung aus normalem Meer-schweinchenserum erhaltenen Komponenten die volle Komplementwirkung wiederherzustellen. Auch in dem mitgeteilten Versuch (cf. Kolumnen h und i) ist hierbei eine deutliche Abschwächung zu bemerken. Berücksichtigt man ferner, daß durch das Erhitzen auf 54° die im derart inaktivierten Meer-schweinchenserum enthaltene relativ stabile Komponente bereits eine gewisse Schädigung erfahren haben kann, und

1) A. Ferrata, Berl. klin. Wochenschr., 1907, No. 13.

daß schließlich eine, wenn auch geringgradige Fortsetzung der Cobragiftwirkung nach Herstellung der Gemische möglich ist, so wird es nicht überraschen können, daß eine vollständige Restitution nicht eintritt oder nur unter besonders günstigen Bedingungen zu erzielen ist.

Unter diesen Umständen glaube ich, daß trotz der erörterten quantitativen Unvollkommenheiten der experimentellen Beweisführung die ermittelten Tatsachen die anfangs vertretene Auffassung zu stützen geeignet sind. Es scheint in der Tat alles dafür zu sprechen, daß im Meerschweinchenserum drei Komponenten differenziert werden können, welche durch ihr Zusammenwirken die als Komplementwirkung bezeichnete Funktion erfüllen. Wenn man für die einerseits an der Globulin-, andererseits an der Albuminfraktion haftenden thermolabilen Agentien die gebräuchlichen Namen „Mittelstück“ und „Endstück“ wohl zweckmäßig beibehält, so kann man die im inaktivierten Serum nachweisbare, relativ thermostabile Funktion vorläufig vielleicht mit dem nichts präjudizierenden Ausdruck „dritte Komponente“ bezeichnen<sup>1)</sup>.

Man wird immerhin die Möglichkeit zu berücksichtigen haben, daß die hier festgestellten Bedingungen bei der mannigfachen Beeinflußbarkeit der Komplementfunktion und ihrer Abhängigkeit von oft geringfügigen Alterationen des Milieus auch in anderer Weise eine Erklärung finden könnten. Aber jedenfalls spricht die Tatsache, daß durch das Zusammenwirken dreier an und für sich und in gegenseitiger Kombination unwirksamer, aus Meerschweinchenserum gewonnener Reagentien die Komplementwirkung vermittelt werden kann, an erster Stelle für die von uns der Analyse zugrunde gelegte Auffassung von der ternären Konstitution des Komplementes.

---

1) Daß nicht etwa durch das Zusammenwirken von Cobragift mit inaktiviertem Meerschweinchenserum eine hämolytische Wirkung resultiert, welche eine aktivierende Funktion vortäuscht, zeigten besondere Kontrollversuche in Bestätigung früherer Erfahrungen von Kyes und Sachs (Berl. klin. Wochenschr., 1903, No. 2—4). Ueberdies ergaben sich mir prinzipiell gleichartige Ergebnisse bei der Inaktivierung des Meerschweinchensersums durch Digerieren mit Bakterien, worüber in einer späteren Arbeit berichtet werden soll.

Es ist vielleicht nicht ohne Interesse, die mitgeteilten Beobachtungen mit einigen früheren Angaben der Literatur zu vergleichen. Wenn wir dabei von den Untersuchungen Manwarings<sup>1)</sup> über auxilytische Stoffe im inaktivierten Normalserum absehen, so wird die Aufmerksamkeit vornehmlich auf die zuerst von Bordet und Gay<sup>2)</sup> ermittelte Tatsache gelenkt, daß sensibilisierte Blutkörperchen, welche durch frisches Pferdeserum nicht gelöst werden, bei dem Zusammenwirken des letzteren mit inaktivem Rinder-serum der Hämolyse anheimfallen. Ich möchte an dieser Stelle auf die Theorie dieses Phänomens nicht näher eingehen und begnüge mich damit, auf die Arbeiten von Sachs und Bauer<sup>3)</sup>, sowie von Bordet und Streng<sup>4)</sup> zu verweisen. Von Interesse ist hier nur die Analogie, welche zwischen frischem Pferdeserum und dem durch Cobragift-wirkung inaktiv gewordenen Meerschweinchenserum einerseits, zwischen inaktiviertem Rinder-serum und inaktiviertem Meer-schweinchenserum andererseits besteht. Die Analogie wird um so enger, als bereits Sachs und Bauer, sowie Streng<sup>5)</sup> gezeigt haben, daß man in der Kombination von Bordet und Gay das inaktivierte Serum auch durch andere Sera ersetzen kann und besonders nach den späteren Untersuchungen von Gengou<sup>6)</sup> auch das inaktivierte Meer-schweinchenserum geeignet ist, im Verein mit dem an und für sich unwirksamen aktiven Pferdeserum sensibilisierte Blutkörperchen aufzulösen. Es fragt sich nun, ob das in der vorliegenden Arbeit beschriebene, das Cobraserum restituierende Prinzip des inaktivierten Meerschweinchenserums mit dem von Gengou beschriebenen, die komplettierende Wirkung des Pferdeserums vermittelnden, identisch ist. Meine

---

1) W. Manwaring, Centralbl. f. Bakt., Orig., Bd. 41, 1906, p. 455 und Bd. 45, 1908, p. 55.

2) J. Bordet et F. P. Gay, Ann. Inst. Pasteur, 1906.

3) H. Sachs und J. Bauer, Arb. a. d. kgl. Inst. f. exper. Therapie zu Frankfurt, Jena (Gustav Fischer) 1907.

4) J. Bordet et O. Streng, Centralbl. f. Bakt., Orig., Bd. 49, 1909, p. 260.

5) O. Streng, diese Zeitschr., Bd. 2, 1909, p. 415.

6) O. Gengou, Centralbl. f. Bakt., Orig., Bd. 52, 1909, p. 515.

Untersuchungen in dieser Hinsicht sind noch nicht zum Abschluß gelangt. Allerdings habe ich in bezug auf das Verhalten des 54°-Serums zu den ambozeptorbeladenen Blutkörperchen einen Parallelismus zu den von Gengou ermittelten Beziehungen feststellen können. Das im inaktiven Meerschweinchenserum enthaltene Prinzip wird nämlich von den sensibilisierten Blutkörperchen nicht gebunden, wie dies folgendes Versuchsbeispiel zeigt.

Absteigende Mengen von 54°-Serum werden mit je 1 ccm sensibilisierten Hammelblutes 1 Stunde bei 37° digeriert. Sodann wurde zentrifugiert:

a) Die Abgüsse wurden mit den Sedimenten von je 1 ccm sensibilisierten Hammelblutes unter Zusatz von je 0,1 ccm Cobraserum digeriert.

b) Die Sedimente wurden mit 0,85-proz. NaCl-Lösung gewaschen und sodann in je 1,75 ccm 0,85-proz. NaCl-Lösung unter Zusatz von je 0,1 ccm Cobraserum aufgenommen.

In einer Kontrollreihe — c — wurden direkt absteigende Mengen 54°-Serums mit je 1 ccm sensibilisierten Hammelblutes unter Zusatz von je 0,1 ccm Cobraserum digeriert.

Das Ergebnis zeigt Tabelle IX.

Tabelle IX.

Mengen des 54°-Serums ccm	Hämolyse von sensibilisiertem Hammelblut durch Cobraserum und absteigende Mengen 54°-Serums		
	a	b	c
0,1	k	Spch	k
0,05	k	0	k
0,025	fk	0	fk
0,015	m	0	m
0,01	w	0	w
0,005	Sp	0	Sp
0,0025	Spch	0	Spch
0,	0	0	0

Wie die Tabelle zeigt, tritt also nicht die geringste Bindung der im inaktiven Meerschweinchenserum enthaltenen Komponente an das sensibilisierte Blut ein. Dagegen haben die Versuche über das Verhalten des isoliert auf sensibilisierte Blutkörperchen einwirkenden Cobraserums einen eindeutigen Ueberblick bisher nicht gestattet.

Was das Verhalten der stabilen Komponente bei der Zerlegung des Serums in die Albumin- und Globulinfraktion an-

langt, so besteht freilich vorläufig ein Gegensatz zwischen meinen Erfahrungen und denjenigen Gengous, welcher auf eine Differenz der wirksamen Agentien hindeuten dürfte; während nämlich nach Gengou der im Verein mit Pferdeserum aktivierende Stoff des inaktiven Meerschweinchenserums bei der Kohlensäurefällung und der Dialyse im Albuminteil zurückbleibt, habe ich die cobraserumaktivierende Komponente vorwiegend im Globulinniederschlag angetroffen (cf. Tabelle VI). Indessen wird man an die Möglichkeit denken müssen, daß es sich hier nur um eine scheinbare, durch geringfügige Abweichungen der Technik veranlaßte Differenz handelt. Muß demnach die Entscheidung der Frage nach den Beziehungen der beiden hier genannten Phänomene weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben, so wäre immerhin darauf hinzuweisen, daß die Identifizierung von vornherein insofern etwas Verlockendes hätte, als sie die von Bordet und seinen Mitarbeitern beschriebene Vermittlung der Komplementwirkung des Pferdeserums durch inaktive Sera nur als einen speziellen Fall der allgemeinen Komplementwirkung aufzufassen gestatten würde. Man könnte sich dann vorstellen, daß das Meerschweinchenserum durch Cobragift derart alteriert wird, daß es dem normalen Pferdeserum entspricht, oder mit anderen Worten, daß dem Pferdeserum die stabilere, zur Komplementwirkung erforderliche dritte Komponente fehlt oder nur in so geringer Menge eigentümlich ist, daß es zur aktivierenden Funktion des Zusammenwirkens inaktiver Sera bedarf. Ob aber eine derartige Auffassung angängig ist und sich mit den Tatsachen vereinigen läßt, müssen, wie gesagt, erst weitere Untersuchungen zeigen. Nur so viel darf ich vielleicht vorläufig erwähnen, daß das inaktivierte Meerschweinchenserum bei der Restitution des Cobragiftes auch durch inaktives Rinderserum ersetzt werden kann, eine Tatsache, die ich vorläufig allerdings ebensowenig, wie die bereits angeführten, im Sinne der Identifizierung mit dem von Bordet und Gay beschriebenen Phänomen aufgefaßt wissen möchte. Denn ein Ersatz des Cobraserums durch Pferdeserum ist nicht ohne weiteres angängig. Man bedarf nämlich zur Reproduktion des von Gengou beschriebenen Phänomens eines weit stärkeren Sensibilisierungsgrades, als für die kombinierte Wirkung von

Cobraserum und 54°-Serum ausreichend ist, wofür allerdings vielleicht ein Mangel an den als Mittelstück und Endstück bezeichneten Komponenten, besonders an letzterer, im Pferdeserum, sowie auch antagonistische Einflüsse verantwortlich gemacht werden könnten.

Kurz verweisen möchte ich noch darauf, daß die Funktion der im inaktiven Meerschweinchenserum enthaltenen dritten Komponente nicht etwa mit den von Altmann<sup>1)</sup> beschriebenen, hämolysebeschleunigenden Substanzen des normalen Serums analogisiert werden kann. Es genügt dabei, daran zu erinnern, daß die von Altmann beschriebenen Substanzen, welche den beschleunigenden Immunistoffen Friedbergers und Moreschis<sup>2)</sup> entsprechen, von den ambozeptorbeladenen Blutkörperchen gebunden werden, was bei der Wirkung des Cobraserums vermittelnden Komponente des 54°-Serums nicht der Fall ist.

Ueber den Mechanismus des Zusammenwirkens der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen, die Komplementfunktion vermittelnden Komponenten ein bestimmtes Urteil zu fällen, insbesondere über die wichtige Frage, in welcher Reihenfolge die einzelnen Komponenten zur Wirkung gelangen, dazu reicht nach alledem das bisherige Material nicht aus. Aber für die antikomplementäre Cobragiftwirkung darf man wohl den Schluß ziehen, daß durch sie wesentlich diejenige Funktion aufgehoben wird, die oben als „dritte Komponente“ bezeichnet worden ist, und welche in dem auf 54° erhitzten Serum noch erhalten bleibt. Muß man daher wohl zwischen dem Mechanismus der Inaktivierung durch  $\frac{1}{2}$ -ständiges Erhitzen auf 54° und demjenigen der Cobragiftwirkung differenzieren, so deuten andererseits manche Erfahrungen darauf hin, daß die Cobragiftwirkung vielleicht ein Paradigma mehrerer im Prinzip gleichartiger Inaktivierungsvorgänge darstellt, wie dies schon in früheren Arbeiten [Ritz und Sachs<sup>3)</sup>, Sachs

1) K. Altmann, diese Zeitschr., Bd. 8, 1910, p. 24.

2) E. Friedberger und C. Moreschi, Centralbl. f. Bakt., Orig., Bd. 45, 1908, p. 346.

3) H. Ritz und H. Sachs, Centralbl. f. Bakt., Ref., Bd. 50, 1911, Beiheft.

und Omorokow<sup>1)</sup>] erörtert wurde. Insbesondere scheinen für die Inaktivierung durch Digerieren mit Bakterien in der Tat ganz ähnliche Verhältnisse zu bestehen. Ob etwa in gleicher Weise auch bei den Komplementbindungsphänomenen der Verlust der Komplementfunktion an erster Stelle auf dem Schwund der „dritten Komponente“ beruht, dies zu entscheiden, muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben. Allerdings würde hiermit die Tatsache, daß die „dritte Komponente“ aus inaktiviertem Meerschweinchenserum von den ambozeptor-beladenen Blutkörperchen nicht gebunden wird, offenbar zunächst in einem gewissen Widerspruch stehen. Weitere Untersuchungen werden daher die Analyse in dieser Richtung vertiefen müssen.

#### Zusammenfassung.

1) Die aus dem durch Cobragiftwirkung inaktivierten Meerschweinchenserum mittels Kohlensäurefällung gewonnenen Globulin- resp. Albuminfraktionen verhalten sich wie normales „Mittelstück“ resp. „Endstück“, ohne aber zusammen komplettierend zu wirken.

2) Die Restitution der Wirkung des durch Cobragift inaktivierten Meerschweinchenserums gelingt nicht nur durch Zusatz von „Mittelstück“ und „Endstück“ des normalen Meerschweinchenserums, sondern auch durch Zusatz von Meerschweinchenserum, das  $\frac{1}{2}$  Stunde lang auf  $54^{\circ}$  erhitzt ist. Dabei ist in letzterem weder Mittelstück noch Endstück nachweisbar.

3) Das im inaktivierten Serum vorhandene das mit Cobragift behandelte Meerschweinchenserum aktivierende Prinzip scheint nur eine relative Thermostabilität zu besitzen. Es ist bei der Kohlensäurefällung in beiden Fraktionen nachweisbar, vorwiegend aber im Globulinteil.

4) Auch in den aus aktivem Meerschweinchenserum gewonnenen Komponenten erweist sich das mit Cobragift behandelte Meerschweinchenserum aktivierende Prinzip beim Erhitzen auf  $54^{\circ}$  als stabil, während dabei die „Mittelstück“-

---

1) l. c.



und „Endstück“-Funktionen der beiden Komponenten aufgehoben werden.

5) Es scheint daher für die Restitution der Wirkung des mit Cobragift behandelten Serums durch „Mittelstück“ und „Endstück“ das in beiden Fraktionen enthaltene stabile Prinzip verantwortlich zu sein.

6) Auf Grund dieser Tatsachen wird die Anschauung erörtert, daß für die Komplementwirkung das Zusammenwirken dreier Komponenten maßgebend ist:

- a) des Mittelstücks,
- b) des Endstücks,
- c) einer dritten Komponente, die in dem auf 54° erhitzten Meerschweinchenserum erhalten ist und durch Cobragiftwirkung ihre Funktion einbüßt.

7) Dementsprechend gelingt es auch aus dem mit Cobragift behandelten Meerschweinchenserum durch Kohlensäurefällung zwei Fraktionen zu erhalten, von denen jede einzelne im Verein mit thermoinaktiviertem Serum unwirksam ist, die aber zusammen bei Zusatz des letzteren wieder die Komplementfunktion ausüben. Die Komplementwirkung kann also durch die Kombination dreier Komponenten restituiert werden.

8) Es wird schließlich auf Aehnlichkeiten verwiesen, welche zwischen dem hier beschriebenen Phänomen und einigen früheren Befunden der Autoren über den Einfluß inaktivierter Sera auf die Komplementfunktion bestehen. Jedoch läßt das bisher vorliegende Material die Frage, ob es sich hier um wesensgleiche Vorgänge handelt oder nicht, noch nicht entscheiden.

*Nachdruck verboten.*

[From the Bacteriological Department Lister Institute, London.]

**The Relation between the Fixation of Complement and  
the Formation of a Precipitate.**

By **H. R. Dean.**

(Eingegangen bei der Redaktion am 24. Januar 1912.)

One of the most interesting problems connected with immunity is the explanation of the process by which complement is absorbed by the mixture of an antigen with its homologous antibody.

One theory explains the phenomenon by assuming the existence of an amboceptor or interbody with two affinities, the one of which unites with the cell to be dissolved, while the other unites with the complement. According to the other view the complement is taken up by the complex formed by the union of cell and antibody, the antibody being supposed to act somewhat after the manner of a mordant.

The fixation of complement experiments of Bordet and Gengou have naturally received two different explanations. According to the one view the complement is fixed by the precipitate which is formed by the union of antigen and antibody; according to the other view precipitation and complement fixation are two entirely separate and independent phenomena. The fixation of complement is attributed to the action of an amboceptor, and some workers have gone so far as to state that a special variety — “a complement-fixing amboceptor” exists. This amboceptor, which they call a Bordet amboceptor, is considered to be distinct from the amboceptor concerned in bacteriolysis.

The controversy which arose between the supporters of these two explanations resulted in the publication of a large number of papers. Only the more important of these communications are here summarised.

In 1901 Bordet and Gengou showed that alexine was fixed by the mixture of a bacillary emulsion with its homo-

logous antiserum. In the same year Widal and Le Sourd (1901) confirmed this result and succeeded in demonstrating that the serum of typhoid fever patients would bind complement in the presence of an emulsion of *Bacillus typhosus*. In 1902 Gengou extended the scope of the reaction by showing that the serum of animals which had been injected with a foreign proteid, had acquired the property of fixing complement if mixed with that proteid. Despite the importance of this discovery, however, the next two years were not productive of any substantial addition to the literature of the subject. Interest in the question appears to have been revived by Moreschi (1905) who pointed out that the results which had been attributed to the action of anticomplements were in reality due to the fixation of complement by a mixture of antiserum with its homologous proteid. In the same year (1905) Neisser and Sachs applied the principles laid down by Moreschi to the production of a practical method for the identification of the blood of different animals. In subsequent papers Moreschi (1906) and Moreschi and Pfeiffer (1906) advanced the view that the complement was taken up by the precipitate. Moreschi concluded that precipitin and precipitinogen unite in variable proportions and form a series of precipitates, which possess a more or less strong anticomplementary action. About the same time and independently of Moreschi the same explanation was put forward by Gay (1905) who came to the conclusion that the precipitate fixed the complement. In support of a criticism of the views of Neisser and Wechsberg (1901) it was shown by Gay 1905 that the amount of interference with haemolysis was in proportion to the amount of precipitate formed, and this to the amount of antiserum present. Klein (1905) found the fixation of complement closely associated with the formation of a precipitate and took up essentially the same position as Moreschi and Gay.

On the other hand Neisser and Sachs (1906) found that the amount of precipitate and the capacity for binding complement stood in no direct proportions. They were able to obtain marked fixation of complement when no precipitate could be recognised. They attributed the fixation of complement

to a union of the complement with the complementophile group of an amboceptor, in strict accordance with the theory of Ehrlich. The question has been critically reviewed by Muir and Martin (1906), who added the results of their experiments on the subject. Muir and Martin found that the fixation of complement was as a rule closely associated with the formation of a precipitate, but were not convinced that precipitation formed a complete explanation of complement fixation. They cited as an instance a rabbit v. guineapig serum which produced, when mixed with its homologous antigen, a faint cloudiness but no definite precipitate. The capacity for fixing complement, however, was possessed by this serum to a very high degree. In other experiments they found that, if the antigen was greatly diluted, no precipitate was formed, but the mixture was able to bind complement efficiently. They also observed during the process of immunising a rabbit with human serum that the complement binding properties of the antiserum could be demonstrated at an earlier date than the precipitating properties. Similar results were obtained by Altmann (1910) who immunised a series of rabbits with *Bacillus paratyphosus* B. In many cases it was found that the serum of these animals developed complement binding properties before they could be shown to have developed agglutinating properties. In the case of one rabbit only, the agglutinative property was the first to appear. After a second injection it was found that the complement-fixing property of the serum was lost during the two days immediately following, while the agglutinating property during the same period showed only a reduction. When rabbits were injected with *Bacillus typhosus* it was found that the development of the two properties ran a fairly parallel course, though there was some tendency for the agglutinative property to appear earlier than the complement-fixing property. When *Bacillus coli* was used for immunisation, the authors found that the power to fix complement appeared earlier in the case of 9 rabbits, but in the case of 2 rabbits marked agglutinative power developed but little or no power to fix complement. Altmann concluded that the discrepancy was due to differences in the individual strains of bacteria. He considered that certain strains

of *Bacillus coli* tended to induce the production of agglutinins while others tended to produce complement-binding antibodies. Altmann regards these experiments as evidence that the agglutinins are distinct from the antibodies which are responsible for complement fixation.

Wassermann and Bruck (1905), who also consider that complement fixation is due to amboceptor action, adopted a different method with the object of supporting their view. A bacterial extract was prepared, which, when mixed with its homologous antiserum, produced a precipitate and also a fixation of complement. This extract was set aside and after the lapse of some time was found to have lost its power of producing a precipitate without any loss of its complement-binding properties. This experiment is quoted by Sachs and Altmann (1909) as conclusive proof of the separate identity of precipitins and complement-binding amboceptors.

Evidence of a similar nature was obtained by Friedberger (1906). This observer heated an antiserum, obtained by injecting a rabbit with sheep serum, for one hour at a temperature of 67° C. This heated serum was found to have lost the property of forming a precipitate while the property of fixing complement had been retained.

By injecting a rabbit with human serum Friedberger obtained an antiserum so powerful that complement fixation could be obtained by the use of extraordinarily small quantities of the antigen (human serum 1 in 1 000 000). When these extraordinarily small amounts of antigen were used no trace of a precipitate could be detected, complement was nevertheless efficiently fixed.

Liefmann (1906) published a series of experiments the general object of which was to obtain conditions under which complement fixation occurred without the formation of a precipitate. In the majority of his experiments he found that the two reactions were closely associated. He found, however, that if a serum (antigen) was heated, it lost its property of forming a precipitate when mixed with the homologous antiserum. Nevertheless a mixture of the heated serum with the antiserum produced a marked fixation of complement. Lief-

mann concluded that the data at his disposal were insufficient to permit of a definite opinion being formed.

In a subsequent paper Moreschi (1906) appears to have obtained results which are at variance with his earlier experiments. He prepared antisera by injecting hens and ducks. The antisera so obtained gave good precipitates but bound no complement.

Other instances of precipitation without complement fixation have been recorded by Sobernheim (1906) who experimented with antituberculous sera obtained by the injection of Tubercle bacilli and tuberculin.

For a complete review of the subject as well as for further references to its literature the reader is referred to the articles on complement fixation by Meier (1909) and Sachs and Altmann (1909).

The above summary shows that the opinion of the majority and, perhaps, the bulk of the evidence is in favour of the view that the complement binding bodies are distinct from the precipitins. The evidence for the separate identity of precipitins and complement binding amboceptors falls under four headings:

- 1) Complement fixation can be demonstrated in mixtures which contain so small a quantity of antigen that no precipitate can be detected.

- 2) Certain antisera have been observed to give a precipitate with little or no complement fixation.

Other antisera have good complement binding properties but form little or no precipitate.

- 3) If either the antiserum or the normal serum (antigen) is heated, the property of forming a precipitate is lost but the property of fixing complement remains. If a bacterial extract is kept for a time it loses its property of forming a precipitate with the homologous antiserum but retains the property of fixing complement.

- 4) During the process of immunisation the complement fixing property has been found to appear before the property of forming a precipitate.

### Object of the Experiments.

The general object of these experiments has been to determine whether any relationship existed between the amount of precipitate formed and the amount of complement fixed. Before describing the experiments it seems advisable to briefly refer to the experiments of Chapman and Welsh. The papers which have been quoted were written at a time when it was generally assumed that the antiserum, the so-called precipitin, precipitated the antigen, the so-called precipitinogen. It was in fact generally held that the precipitate was derived from the antigen. Chapman and Welsh (1906—1911) have, however, shown by numerous and exact experiments that the precipitate is almost if not entirely derived from the antiserum. It is the antiserum, in other words, which is precipitated by the antigen. It follows then that the amount of the precipitate is proportional to the amount of antiserum present. If then the formation of a precipitate is the cause of the fixation of complement, it becomes necessary to show that the amount of complement fixed is proportional to the amount of antiserum present. As already stated, Gay arrived at this conclusion in his explanation of the deviation effects produced by excess of antiserum in haemolysis. It is not however, an easy matter to show that this relationship exists, for as will be seen later, the amount of the precipitate is not the only factor which determines the amount of complement fixed.

It is necessary to refer to one other point in connexion with precipitation. Chapman and Welsh found that a considerable time (up to 96 hours) was necessary for the complete precipitation of a given quantity of antiserum. In a complement fixation experiment it is obviously necessary to allow only a short time (about one hour) for the reaction. In the experiments to be described it was desired to compare the amount of complement fixed with the amount of precipitate formed. To do so it became necessary to estimate the amount of precipitate formed during the time allowed for the fixation of complement. The figures given in the tables represent the precipitate formed in a given time and do not necessarily

represent the entire precipitable content of the amount of antiserum employed.

**The Method of the Preparation of Antisera and other Material used in the Experiments.**

Very little need be said as to the preparation of the antisera, which were all obtained from rabbits which had been immunised either by the intravenous or the intraperitoneal method. Intravenous injection was used in nearly every case and in most cases some four to six injections were given at intervals of four days. The sera were inactivated before use by heating for half an hour at 56° C. The antigens employed were egg-white, horse serum, goat serum, human serum, monkey serum and emulsions in normal saline solutions of a 24 hours agar culture of *Bacillus typhosus*. The bacterial extracts used in some of the experiments were prepared by a method described in the Proceedings of the Royal Society of Medicine (Pathological Section), Vol. 4, 1911, No. 6, p. 251.

The red corpuscles used in the complement fixation experiments were obtained by defibrinating the blood of a sheep and then washing the corpuscles in three changes of saline solution. The haemolytic serum was inactivated by heating for half an hour at a temperature of 56° C. Fresh guineapig serum obtained from an animal killed on the day of the experiment was used as complement.

**Description of Experiments and Results.**

In the majority of these experiments the following method was employed: A series of progressive dilutions of the antigen was prepared in such a way that each successive tube contained half the amount of antigen contained in the tube immediately preceding it in the series. To every tube was then added a constant quantity of the antiserum. As a rule four such sets of tubes were prepared. One of these sets was set aside, that the appearance and amount of the precipitate in each tube might be observed and recorded. To the other sets was added complement in three different quantities or doses and, after one hour's incubation, a sufficient quantity of sheep corpuscles and haemolytic serum. The set, to which



no complement was added, provided a series precipitates which varied not only in actual amount, but also in the rate of formation and in the size of their constituent particles. The other three sets of tubes provided a roughly quantitative measure of the amount of complement bound by the various precipitates produced.

The progress of events in the tubes set aside for precipitation was as follows: Immediately after antigen and antibody had been mixed, a distinct turbidity was visible in two or three of the tubes of the series. The tubes which showed an instantaneous change were those tubes which contained antigen and antibody in the proportions most favourable to the formation of precipitate. After five or ten minutes or even sooner very small particles became visible in the tubes which had been the first to become turbid. Below what may be termed the zone of optimal precipitation, that is to say, in the tubes which contained less than the optimal amount of antigen, turbidity in various degrees gave place gradually and progressively, tube by tube, to a condition in which the individual particles became visible to the naked eye. The particles in the tubes of the zone of maximal precipitation rapidly increased in size and at the end of some twenty minutes it was usual to find that in two or three tubes large flocculi had separated, which rapidly fell to the bottom of the tube leaving a perfectly clear supernatant fluid.

In such a series of tubes it was possible to recognize three zones: 1) A zone where the proportion of antigen to antibody was such as to produce rapid and complete precipitation. It may be assumed that in these tubes the antigen was able to rapidly precipitate the precipitable substance of the antiserum. 2) A zone in which the antibody was present in relative excess. In these tubes turbidity made its appearance slowly and uniform turbidity slowly gave place to a condition in which small particles could be distinguished. In tubes in which a great excess of antibody was present, the appearance of turbidity was still further delayed and, during the time of the experiment, the precipitation process did not go beyond the formation of an apparently homogeneous turbidity. 3) A zone where the antigen was present in relative excess. In

these tubes the process of precipitation was slow. Turbidity appeared only after a considerable interval and the appearance of separate particles was often delayed for some hours. A great excess of antigen entirely inhibited the formation of a precipitate.

Relative excess either of antigen or antibody was found to slow the process of precipitation and if the excess was at all considerable to lessen the amount of the precipitate.

The results of a typical experiment are given in table I.

### Description of Experiment I and Notes on the Course of the Reaction.

Column A represents the results of the precipitin experiment. Columns B, C, and D represent the results of the complement-fixation experiments.

The tubes 1 to 11 in column A contained a bulk of 10 c. c. made up of 5 c. c. of the diluted goat serum (antigen) and 5 c. c. of a 1 in 10 dilution of rabbit and goat serum (antibody). The lower portion of each of these tubes was narrow and calibrated. The tubes were incubated for 4 hours at 37° C and the progress of the precipitation was observed and recorded at regular intervals. Immediately after mixing turbidity appeared in tubes 2 and 3.

At the expiration of 10 minutes flocculi were apparent in tubes 2 and 3 and tubes 1, 4 and 5 showed uniform turbidity. After half an hour large flocculi, which had formed in tubes 2, 3 and 4, had fallen to the bottom of the tubes and left a clear supernatant fluid. Flocculi had formed in tube 1 but had separated less completely. Small particles were visible in tube 5 and just visible in tube 6. In tubes 7 and 8 turbidity was present without visible particles. After one hour the first 6 tubes showed a deposit and a clear supernatant fluid. Tube 7 showed small particles suspended uniformly throughout its contents. In tubes 8, 9 and 10 a progressively diminishing opalescence was seen. After four hours all the tubes were centrifugalised and the actual amount of the deposited precipitate was read. The figures are recorded in column A.

In order to save unnecessary complexity the necessary control tubes have been omitted from the table. Control tubes containing the various dilutions of antigen without antiserum, and a tube containing a 1 in 10 dilution of the antiserum without antigen were incubated for the same period (4 hours) and remained absolutely clear.

The tubes in columns B, C and D received each 0.5 c. c. of the various dilutions of goat serum (Antigen) shown in the table. To all the tubes were then added 0.5 c. c. of a 1 in 10 dilution of antiserum and 0.5 c. c. of diluted guineapig complement. The tubes in column B received 0.05 c. c. guineapig serum diluted to 0.5 c. c.; in column C 0.1 c. c. guinea-








pig serum diluted to 0.5 c. c. and in column D 0.2 c. c. guineapig serum diluted to 0.5 c. c. All the tubes were then incubated for one hour at 37° C in the same incubator as the tubes prepared for the precipitin reaction. Both the precipitin and the complement fixation experiments were carried out with the same materials and as nearly as possible at the same time, and under the same conditions. After one hour's incubation all the tubes received 0.5 c. c. of a 1 in 20 suspension of washed sheep corpuscles and 0.5 c. c. of a 1 in 500 dilution of haemolysin (rabbit v. sheep). The tubes were then incubated for one hour, at the end of which time the results were read and recorded.

The fresh guineapig serum (complement) was separately titrated and its value determined. 0.02 of this serum diluted to 0.5 c. c. and added to 0.5 c. c. of a 1 in 500 dilution of haemolysin, 0.5 c. c. of a 1 in 20 suspension of sheep cells and 1 c. c. of normal saline solution produced complete haemolysis after one hour at 37° C. This was the smallest quantity of complement which produced complete haemolysis acting in conjunction with 0.5 c. c. of a 1 in 500 dilution (= 2 haemolytic doses) of the haemolytic serum. If we accept 0.02 c. c. as one lytic dose of the complement, column B represents the fixation of  $2^{1/2}$  minimal lytic doses of complement, column C 5 minimal lytic doses, and column D 10 minimal lytic doses.

In the case of tube 6 of column D, nearly 10 doses of complement were fixed. A titration of the antiserum (rabbit v. goat) established the fact that this serum had a strong haemolytic action on sheep corpuscles. This explains the fact that in this experiment complement-fixation was not a more delicate indicator of the presence of a trace of antigen than the precipitin reaction.


































It appears from this experiment that using a 1 in 10 dilution of antiserum the largest precipitate was obtained by adding an equal quantity of a 1 in 10 dilution of antigen. The greatest fixation of complement was obtained by adding to a 1 in 10 dilution of antiserum an equal quantity of a 1 in 320 dilution of antigen.

Each tube in the original experiment is represented by a square in the table. A black square represents total haemolysis or no fixation of complement. A white square represents a tube in which no haemolysis has occurred, that is to say a tube in which all the complement has been fixed.

- |   |                             |
|---|-----------------------------|
|  | No Haemolysis               |
|  | Trace Haemolysis            |
|  | Slight Haemolysis           |
|  | Half Haemolysed             |
|  | Strong or Marked Haemolysis |
|  | Almost complete Haemolysis  |
|  | Complete Haemolysis         |

Explanation of Scheme used to illustrate the complement fixation Experiments.

Table I.

	Dilutions of normal Goat Serum (antigen)	(A) 1 in 10 dilution of Rabbit v. Goat Serum (antibody). Amount of precipitate formed	1 in 10 dilution of Rabbit v. Goat Serum (antibody)		
			(B) 0.05 c. c. guineapig complement	(C) 0.1 c. c.	(D) 0.2 c. c.
(1)	1 in 10	90			
(2)	1 in 20	60			
(3)	1 in 40	40			
(4)	1 in 80	45			
(5)	1 in 160	40			
(6)	1 in 320	30			
(7)	1 in 640	10			
(8)	1 in 1280	5			
(9)	1 in 2560	Large trace			
(10)	1 in 5120	Trace			
(11)	1 in 10240	Nil			

## Remarks on Table I.

From a consideration of Table I it is evident that the proportions of antigen and antibody which produce the largest quantity of precipitate are not those which effect the greatest fixation of complement. In this case a mixture of a 1 in 10 dilution of antigen with a 1 in 10 dilution of antiserum produced a large precipitate but did not fix  $2\frac{1}{2}$  minimal lytic doses of complement. Similar and consistent results were

obtained by mixing a variety of antigens with the homologous antiserum. It was determined that mixtures which rapidly produced a large flocculent precipitate had little or no power to bind complement. If, however, the relative properties of antigen and antibody were such that the precipitate formed slowly, the mixture was found to have very distinct power to bind complement. Roughly speaking the maximal fixation of complement corresponded to the mixture of antigen and antibody which at the expiration of half an hour showed the greatest uniform turbidity. If to a series of dilutions of the antigen was added a constant amount of antibody, two tubes could be picked out from the set: the one contained the proportions of antigen and antibody which produced the largest precipitate, the other the proportions of antigen and antibody most favourable to complement fixation. With constant antibody the amount of antigen necessary to produce the maximal fixation of complement was much smaller than the amount of antigen necessary to produce the largest amount of precipitate. In the experiment recorded in Table I it was found that thirty times as much antigen was required to produce the maximal precipitate as was necessary to produce the maximal fixation of complement.

The process which causes both precipitation and complement fixation is in all probability the aggregation of molecules present in the antiserum by the action of the antigen. When sufficient antigen is present, aggregation takes place energetically and large flocculi are rapidly separated. These are the conditions favourable to the precipitation reaction. If a relatively smaller amount of antigen is present, the process of aggregation is slower and less complete. These are the conditions favourable to complement fixation.

Under these conditions the individual particles which form the precipitate are extremely small, but the surface afforded by all the particles of such a precipitate must be much larger than that offered by a precipitate composed of large flocculi.

It is indeed possible that there is a direct relationship between the surface area of the particles of the precipitate and the amount of complement absorbed. In any case it is probable, for reasons that will appear from an experiment to

be described later (Table II), that complement is fixed during the earliest stages of the formation of the precipitate and that consequently the proportions of antigen and antibody which cause a very slow precipitation are those favourable to the fixation of complement. The fixation of complement seems to stand in close relationship with the rate of formation and the state of division of the precipitate. It can, in fact, be shown experimentally that either complement-fixation or precipitation can be produced with the same antigen and the same antibody by merely varying the proportions of the mixture. It is obvious, then, that the fact that complement-fixation and precipitation do not run a parallel course affords no evidence of the separate existence of two varieties of antibody — namely precipitins and amboceptors — for the proportions which favour the rapid formation of a large precipitate are unfavourable to the fixation of complement, and the proportions which effect the best fixation of complement do not lead to the rapid formation of a precipitate. It will be remembered that in Wassermann and Bruck's experiment the fresh bacterial extract had the power of producing a precipitate and of fixing complement. The extract was then put aside and at the time of the second experiment it was found to have lost its precipitating powers without loss of its complement binding properties. This result, can, I think, be explained without postulating the existence of two different antibodies. It seems probable that during the interval between the first and second experiments a destruction of the specific antigen had taken place and that at the time of the second experiment the antigen content of the extract had been so far reduced that there was no longer sufficient to produce a visible precipitate. The conditions were, nevertheless, exactly those which have been shown to be favourable to the fixation of complement — namely, the presence of a relatively small quantity of antigen and a relatively large quantity of antibody.

A similar explanation probably holds good for some experiments of Liefmann and of Friedberger. In Friedberger's experiment the antiserum was heated for one hour at 67° C. and was then found to have lost its precipitating property but not its complement-fixing property. The effect

of heating on the antiserum, was probably to render the precipitation process slow and incomplete. These are the very conditions under which complement is best fixed. Liefmann heated the antigen-containing serum and destroyed its power of forming a precipitate without interfering with its complement binding power. This experiment is probably capable of the same explanation.

With the majority of antisera investigated it was found possible to demonstrate that the proportions which rapidly produced a precipitate did not effectively bind complement. There were however two exceptions in the series. In the case of these antisera, which were both exceptionally "weak", the precipitate was only very slowly formed even when large quantities of antigen were used. It was not found possible in these cases to find proportions of antigen and antibody which produced a precipitate without binding complement. With these antisera, in which precipitation was always slight and slow, the amount of complement fixed was always proportional to the degree of turbidity produced. If, however, the antiserum was a "good" antiserum it was always found possible to prepare a mixture of antigen and antibody in proportions which would rapidly precipitate but which did not fix complement.

#### Experiment II (Table II).

In this experiment the complement was added immediately and at varying periods after the mixtures of antigen and antibody were made. Ten identical sets of antigen dilutions were prepared. To all the tubes was added the same amount of antiserum. One set was set aside for observations on the rate and degree of precipitation. Turbidity appeared immediately after mixing in the first four tubes. After 10 minutes flocculi had appeared in the first three tubes and tubes 4 and 5 showed turbidity. After half an hour large flocculi had separated leaving a clear fluid in the first three tubes, tube 4 showed smaller flocculi, and tube 5 minute particles. Tube 6 showed marked uniform turbidity. Slight opalescence was present in 7 and 8. After one hour the precipitate had deposited in the first three tubes. In tubes 4, 5 and 6 smaller particles were still suspended in the fluid. Tubes 7 and 8 showed distinct turbidity and a trace of opalescence could be detected in tube 9.

The other nine sets of tubes were treated as follows: To the first three sets complement in three different dilutions was added and then to every tube the same amount of antibody. In the next three sets the anti-

body was added directly to the antigen and the tubes were incubated for half an hour. The complement was then added. In the next three sets the antigen and antibody mixtures were incubated for one hour before the addition of complement. After the addition of complement each set of tubes was incubated for one hour, when a suitable mixture of corpuscles and haemolytic serum was added. Each set was then incubated for a further period of one hour, at the end of which time the results were read and recorded. The experiment shows the result of adding complement at various times after the mixture of the antigen with the antibody. A full set of control tubes was also prepared. In all of these tubes complete haemolysis occurred.

Table II.

Antiserum 1 in 10 (Rabbit v. Goat).

Dilution of Goat Serum (antigen)	Complement added immediately			after 1/2 hr. Fresh guineapig serum			after 1 hr.		
	0.05	0.1	0.2	0.05	0.1	0.2	0.05	0.1	0.2
(1) 1 in 10	■	■	■	■	■	■	■	■	■
(2) 1 in 20	■	■	■	■	■	■	■	■	■
(3) 1 in 40	□	■	■	■	■	■	■	■	■
(4) 1 in 80	□	□	■	■	■	■	■	■	■
(5) 1 in 160	□	□	■	□	■	■	■	■	■
(6) 1 in 320	□	□	■	□	□	■	□	■	■
(7) 1 in 640	□	■	■	□	□	■	□	■	■
(8) 1 in 1280	□	■	■	■	■	■	■	■	■
(9) 1 in 2560	■	■	■	■	■	■	■	■	■
(10) 1 in 5120	■	■	■	■	■	■	■	■	■

## Remarks on Table II.

It is quite apparent that to obtain the greatest fixation the complement should be present from the time when antigen is mixed with antibody. After half an hour's preliminary incubation there was a marked reduction in the complement binding power of the mixtures. If one hour was allowed to elapse



before complement was added very little fixation took place. As was anticipated this loss of complement binding power was more marked in the tubes in which the precipitation process was rapid. A comparison of the results obtained in tubes 4 to 8 in the various columns shows this point clearly. With the immediate addition of complement the maximum fixation occurred in tube 5, which contained a mixture of 1 in 160 antigen with 1 in 10 antibody. When half an hour had been allowed to pass before complement was added the contents of tube 5 showed little power to fix complement while tube 6 which contained a mixture of 1 in 320 antigen with 1 in 10 antibody showed the best fixation of complement. The experiment bears out the view that complement is not fixed to any extent by the particles of a visible precipitate. It is probable that complement is fixed during the very earliest stage of the precipitation process at a time when the individual aggregates are so small that no turbidity is visible. When on the other hand the process has advanced to a stage at which visible precipitation occurs, the conditions necessary for the fixation of complement, are no longer present.

### Experiment III (Table III).

In Experiment III the amounts of precipitate which occur when varying quantities of antigen are added to a constant quantity of antibody have been accurately measured and are recorded in Table II.

The table shows that the amount of the precipitate formed depends on the relative proportions of antigen and antibody present in the mixture. With a 1 in 5 dilution of antiserum the largest precipitate was obtained by adding a 1 in 8 dilution of antigen. With half the quantity of antiserum (1 in 10) the largest precipitate was obtained by adding a 1 in 16 dilution of antigen. The largest precipitate obtained with the 1 in 10 dilution of antiserum was about half the largest amount obtained by the use of twice as much antiserum (1 in 5 dilution). This is in accord with the view of Chapman and Welsh that the amount of the precipitate is proportional to the amount of antiserum present. One of the main results of all these experiments was to show that for any quantity of antiserum there exists a quantity of antigen which is capable within a definite period of time, of producing the largest precipitate obtainable from such a quantity of antiserum. Table III also illustrates very clearly the inhibitory effect of relative excess of antigen. This is plainly seen by comparing the figures in the two columns. A 1 in 4 antigen dilution, which constituted a marked antigen excess for an equal quantity of 1 in 10 antiserum, pro-

duced almost the largest precipitate of the series when mixed with a 1 in 5 dilution of antiserum.

Table III.

	5 c.c. Dilutions of Normal Horse serum (antigen)	5 c.c. of a 1 in 5 dilution of Rabbit v. Horse serum (antibody)	5 c.c. of a 1 in 10 dilution of Rabbit v. Horse serum	5 c.c. Normal saline solution
(1)	Undiluted serum	7	0.5	Clear
(2)	Diluted 1 in 2	14	3	"
(3)	" 1 in 4	19	6.5	"
(4)	" 1 in 8	20	8	"
(5)	" 1 in 16	11	12	"
(6)	" 1 in 32	6	6	"
(7)	" 1 in 64	4	2.5	"
(8)	" 1 in 128	3	1.5	"
(9)	" 1 in 256	2	0.75	"
(10)	" 1 in 512	1	0.5	"
(11)	" 1 in 1024	0.75	less than 0.5	"
(12)	5 c.c. normal saline solution	clear	clear	

Three sets of dilutions of horse serum were prepared. To one set was added an equal quantity of a 1 in 5 dilution of antiserum, to another set was added a 1 in 10 dilution of the antiserum. The third set received an equal quantity of normal saline solution and acted as an antigen control. The antiserum controls are shown in the tubes numbered 12. All the tubes were incubated for 4 hours at 37° C and then placed overnight in the cold room. The tubes were then centrifuged for one hour. The tubes ended in a narrow portion, which was calibrated in such a way that the amount of the precipitate could be accurately determined. The relative quantities of the precipitates in each tube are indicated by the figures.

#### Experiment IV (Table IV).

Experiment IV is designed to show more clearly the influence of excess of antigen on the resulting precipitate.

In the first two tubes the excess of antigen was so great that no trace of a precipitate appeared. In tube 3 the antigen was still present in relative excess although it contained only twice the optimal quantity of antigen. The effect of this excess was to render precipitation slow and imperfect. Opalescence only slowly made its appearance in this tube and after a considerable delay a few large flocculi became visible. Precipitation was even to the end of the experiment very incomplete and the contents of the tube remained permanently opalescent. It will be noticed that, if the proportions of antigen and antibody are approximately correct, precipitation rapidly proceeds by a process of aggregation of particles to the formation of definite flocculi which fall to the bottom and leave a clear fluid. If there is an excess either of antigen or antibody a condition of homogeneous turbidity or opalescence is the result.

The mixture in which this slowing of precipitation is due to antibody excess have always very considerable power to bind complement. On the other hand complement is not bound by mixtures in which antigen excess is responsible for imperfect precipitation. It will be seen from this and other tables that the precipitation reaction appears to be much more easily inhibited by excess of antigen than by excess of antibody. In Table IV where the largest precipitate was produced by a 1 in 10 dilution, four times this quantity of antigen entirely inhibited the reaction, while a slight opalescence could be produced by the use of a  $\frac{1}{1,000}$ th part of this quantity.

Table IV.

Precipitation Experiment.		
	Dilutions of Goat serum (antigen)	Rabbit v. Goat serum (antibody) Diluted 1 in 10
(1)	4 in 5	No deposit
(2)	2 in 5	No deposit
(3)	1 in 5	0.03
(4)	1 in 10	0.11
(5)	1 in 20	0.07
(6)	1 in 40	0.05
(7)	1 in 80	0.06
(8)	1 in 160	0.05
(9)	1 in 320	0.04
(10)	1 in 640	0.02
(11)	1 in 1280	0.01
(12)	1 in 2560	Large trace.
(13)	1 in 5120	Trace.
(14)	1 in 10 240	No deposit. Opalescent.
(15)	1 in 20 480	No deposit. Opalescent.
(16)	1 in 40 960	No deposit. Clear.

The various amounts of antigen indicated in the table were mixed with a constant quantity of antiserum. The progress of precipitation was as follows:



















Immediately after mixing opalescence appeared in tubes 4 to 9. Small particles appeared after five minutes in tube 5 and shortly afterwards in tubes 4 and 6. After ten minutes big flocculi were present in tubes 4 and 5, and small flocculi in tube 6. After half an hour tubes 1 and 2 were still clear; tube 3 was opalescent; in 4, 5, and 6 large flocculi had fallen to the bottom of the tube leaving a clear supernatant fluid; in 7 and 8 small particles were present; 9, 10, and 11 showed diminishing grades of uniform turbidity. After 2 hours tubes 1 and 2 were clear; in 3 a few flocculi had formed and fallen to the bottom but the supernatant fluid was opalescent, in 4 to 11 the precipitate had settled to the bottom leaving a clear supernatant fluid; 12 contained small particles still suspended in the fluid; 13 and 14 were distinctly opalescent, and 15 showed a trace of opalescence.

After 3 hours the deposits were brought down by the centrifuge and their amounts recorded. Tubes 3, 14 and 15 remained opalescent after centrifugalisation. Antigen and antibody controls were put up and remained clear.

## Experiment V (Table V).

In this experiment an attempt has been made to show the effect of antigen excess in both precipitation and complement fixation. It will be seen that as regards precipitation the effect of the excess of antigen becomes more marked as the antiserum becomes more dilute. The complement-fixation is more susceptible to the influence of antigen than the precipitation. There are two reasons for the inhibition of complement-fixation by antigen excess which occur under two different sets of conditions. With great antigen excess, no precipitation occurs, the mixture remains clear, and no complement is fixed. With a less quantity of antigen a large precipitate is formed. These are the conditions which, as has already been shown, are most favourable to the formation of a precipitate but which do not favour the fixation of complement. If a long series of tubes is prepared in which various amounts of antigen are mixed with a constant amount of antibody, a variety of zones may be differentiated. The largest amounts of antigen entirely inhibit both precipitation and complement-fixation and the mixture remains clear. In the next zone precipitation is delayed and incomplete, and no complement is fixed. In the third zone

Table V.

		Antiserum Rabbit v. Goat.					
Dilutions of Goat Serum (antigen)		Diluted 1 in 10	Diluted 1 in 10	Diluted 1 in 20	Diluted 1 in 20	Diluted 1 in 40	Diluted 1 in 40
		Precipitation	Complement Fixation	Precipitation	Complement Fixation	Precipitation	Complement Fixation
(1)	1 in 10	Large Deposit		Trace Deposit		No Precipitate	
(2)	1 in 20	Large Deposit		Small Deposit		No Precipitate	
(3)	1 in 40	Large Deposit		Deposit		Trace Deposit	
(4)	1 in 80	Large Deposit		Deposit		Very small Deposit	
(5)	1 in 160	Large Deposit		Deposit		Very small Deposit	
(6)	1 in 320	Deposit		Deposit		Very small Deposit	

For the sake of simplicity the controls have been omitted from the table. All the usual control tubes were set up and were satisfactory. Six sets of antigen dilutions were put up. Three sets were reserved for the precipitation experiment and three sets for the complement fixation experiment.

precipitation is rapid and complete, but no complement is fixed. In the fourth zone precipitation begins again to be delayed and is less complete. These proportions represent for precipitation a slight antibody excess, nevertheless it is in this zone that complement-fixation appears and reaches its maximum. In the fifth zone precipitation is greatly delayed and is very incomplete. In this zone complement-fixation is well marked but nevertheless decreases tube by tube with the precipitate. In the sixth zone complement fixation can be demonstrated for a variable number of tubes after all evidence of precipitation has disappeared.

### Experiment VI (Table VI).

This experiment is designed to show that similar inhibition phenomena occur in reactions between bacterial antigen and its corresponding antibody.

It might be supposed that the inhibitory influence in the precipitate formation shown in the first three tubes of the experiment recorded in Table IV was due not so much to excess of specific antigen as to the presence of a relatively large amount of colloidal material or to a relatively small quantity of electrolytes. The antigen employed in this case was a distilled water extract of *Bacillus typhosus*. This extract contained very little proteid and the fact that with this extract it was possible to demonstrate the influence of antigen excess, is proof that the inhibition is really due to an excess of the actual antigen.

In other respects Table VI shows the same points as Table III. The influence of the relative proportions of antigen and antibody on the amount

Table VI.

	5 c.c. Dilutions of Extract of <i>B. typhosus</i> (antigen)	5 c.c. of a 1 in 5 dilution of Antityphoid serum (antibody)	5 c.c. of a 1 in 20 dilution of Antityphoid serum	5 c.c. Normal saline solution (Extract controls)
(1)	Undiluted	15	Very slight trace	Clear
(2)	Diluted 1 in 2	8	1	"
(3)	" 1 in 4	6	3	"
(4)	" 1 in 8	3	2	"
(5)	" 1 in 16	1.5	1	"
(6)	" 1 in 32	0.75	0.5	"
(7)	" 1 in 64	0.5	0.25	"
		Serum controls:		
(8)	5 c.c. Normal Saline solution	Clear	Clear	

Three sets of dilutions of typhoid extract were prepared. To the first set was added an equal quantity of a 1 in 5 dilution of antityphoid serum; to the second set was added a 1 in 20 dilution; to the third set normal saline. The tubes were incubated for three hours and then allowed to stand overnight in the cold room. On the next day the precipitate was brought down with a centrifuge and the amount of each precipitate was recorded.

of the precipitate are well shown. The method employed for measuring the amount of the precipitate was not of course extremely accurate, nevertheless the figures are sufficiently close to lend considerable support to the views of Chapman and Welsh. It will be seen from tube 2 that a mixture of 1 in 2 antigen with 1 in 5 antiserum produced a precipitate of 8. Tube 4 shows that a mixture of one quarter of the amount of antibody produced one quarter of the amount of precipitate.

**On the quantitative Relations of Antigen and Antibody in Precipitation and Complement Fixation Experiments.**

It will be seen from the experiments which have been described that the question of the relative proportions of antigen and antibody is one of the greatest importance in both the precipitation and the complement-fixation reaction. Chapman and Welsh have shown that from any given quantity of antiserum a certain definite quantity of precipitate can be obtained. According to their view, the amount of precipitate is directly proportional to the amount of antiserum present. If to a constant quantity of antiserum are added various quantities of antigen the amount of the precipitate will in all cases be the same, provided that sufficient time be allowed for complete precipitation to take place. The larger quantities will rapidly precipitate the precipitable substance of the antiserum and the smaller quantities will precipitate it very slowly, but ultimately the same amount of precipitate will be produced.

In the experiments described in this paper precipitation has only been allowed to proceed for a limited time. When a short time only is allowed for precipitation, the results necessarily differ widely from the figures obtained by Chapman and Welsh. When only a short time is allowed, the amount of the precipitate depends on the relative proportions of antigen and antibody. That is to say for any given quantity of antiserum a quantity of antigen can be found which is able to rapidly precipitate the precipitable substance in the given quantity of antiserum. Such a mixture may be said to contain antigen and antibody in optimal or equivalent proportions. In such a mixture particles appear almost immediately and after a few minutes large flocculi have aggregated together and fallen to the bottom of the tube leaving a perfectly clear supernatant fluid

in which apparently no further precipitate is formed. The whole process is under these conditions complete within a few minutes.

The importance of equivalent proportions of antigen and antibody for precipitation is fairly well shown in Tables III and VI.

If a series of quantities of antigen are mixed with a constant amount of antiserum and if the mixtures are centrifuged after a few hours it is found that for any given quantity of antiserum there exists a quantity of antigen which is able to produce the largest precipitate. If, to a duplicate series of amounts of antigen there be added half the amount of antiserum the largest precipitate will be half the amount of the largest precipitate of the first series and it will be found in the tube which contains half the amount of antigen which produced the largest precipitate in the first series.

The amount of the precipitate can be shown to be proportional to the amount of antiserum 1) by adding any amount of antigen and waiting until precipitation is complete; 2) within a shorter period of time by adding the optimal amount of antigen.

In complement-fixation the matter of equivalent proportions is of even greater importance for it is essential that the experiment be carried out within a comparatively short period of time. It has been shown that the proportions of antigen and antibody which produce the most effective precipitation are not as a rule those which produce the greatest fixation of complement. For any quantity of antiserum it is generally possible to select two quantities of antigen — the one will produce the most rapid and complete precipitation, the other the greatest fixation of complement. The quantity which produces the best precipitation is many times greater than the quantity which produces the best fixation of complement. The fixation of complement is in fact dependent on two factors, the one is the amount of the precipitate, the other is the state of division of the particles of the precipitate or rather the rate at which the precipitate is formed. The amount of complement fixed is proportional to the amount of the precipitate provided that the precipitate is slowly formed. To show that the amount

of complement fixed is proportional to the amount of antiserum present, it is obviously necessary to add to each quantity of antiserum the optimal quantity of antigen.

**On the Use optimal Proportions in the practical Application of the Complement Fixation Test.**

**Experiment VII (Table VII and VIII).**

It has been shown that complement is best fixed when antigen and antibody are mixed in optimal proportions which have to be determined for any antigen and antiserum by actual experiment.

The experiments recorded in Tables VII and VIII show fairly clearly the inhibitory influence of the presence of a relative excess either of antigen or of antiserum. The complement-fixation reaction is frequently used for detecting the presence of antigen or of antibody, for the purposes of diagnosis. If the material which is being investigated contains only a trace of the specific antigen, its presence can only be demonstrated by adding an approximately equivalent quantity of antiserum. For instance it will be seen in Table VIII that the presence of antigen in an extract dilution of 1 in 1280 could be demonstrated by adding an antiserum dilution of 1 in 20: smaller and larger quantities of the antiserum failed to show any fixation of complement. Table VII show that when the antiserum was diluted to 1 in 300, it was necessary to dilute the extract considerably (1 in 32) before any marked fixation of complement could be demonstrated.

Since the correct proportions must in every case be ascertained by direct experiments it follows that it is advisable to use many quantities both of the antigen and of the antiserum if it is desired to detect the presence of a minute trace of either.

The complement-fixation method is often used for the quantitative estimation both of antigen and of antibody. It has been recommended as a method of determining the "strength" of antimeningococcus serum and efforts have been made to devise a method for giving a quantitative value to the results of the Wassermann reaction. In one method a constant quantity of the antigen is selected and titrated with falling quantities of antiserum. The probable result of this method is seen in Table VII. If a 1 in 8 dilution of extract had been selected as the constant quantity of antigen, the limit of the antiserum is reached at a dilution of 1 in 100. Had a 1 in 32 dilution of extract been selected the limit would not have been reached until the antiserum had been diluted to 1 in 300. The apparent titre of the antiserum is in fact determined by the quantity of extract (antigen) selected.



















































The other method is to keep the dilution of antiserum constant and to use falling dilutions of the extract. The results to be expected from this method are shown in Table VIII.

It will be seen from this experiment that if an antiserum dilution of 1 in 5 was taken, the extract could be diluted to 1 in 320 but if the anti-



serum dilution selected was 1 in 20 the extract could be diluted to 1 in 1280. The result arrived at is that the serum dilution 1 in 20 is stronger than the serum dilution 1 in 5. If we suppose that the 1 in 5 serum dilution represents a constant quantity of an antiserum A and that the 1 in 20 dilution represents an equal quantity of another antiserum, we arrive by this method at a result which shows that antiserum B is stronger than antiserum A. It is equally obvious that the strength of the extract could

Table VII.

	Dilutions of Typhoid Extract	Anti-typhoid Serum diluted 1 in 5	Diluted 1 in 50	Diluted 1 in 100	Diluted 1 in 300	Normal Saline Solution Extract Controls
(1)	1 in 4					
(2)	1 in 8					
(3)	1 in 16					
(4)	1 in 32					
(5)	1 in 64					
(6)	1 in 128					
(7)	1 in 256					
(8)	1 in 512					
(9)	1 in 1024					
(10)	(Serum Controls)					

The results shown in this table were obtained by mixing 9 quantities of an extract of *Bacillus typhosus* with 4 quantities of an antityphoid serum. The extract and serum were the same as those used in the precipitation experiment recorded in Table VI. This experiment was carried out in the same manner as experiment VIII. (See Footnote to Table VIII.)

not have been determined either by taking a constant amount of extract and falling quantities of antiserum or by taking a constant amount of antiserum and titrating it with falling quantities of extract.

As far as these experiments go it appears that if a constant quantity of extract be added to varying quantities of antiserum valid relative differences can be obtained between two given sera. If, however, varying

Table VIII.  
Dilutions of Antityphoid Serum.

	Dilutions Typhoid Extract	1 in 5	1 in 10	1 in 20	1 in 40	1 in 80	1 in 160	1 in 320	Normal Saline Extract Control
(1)	1 in 5								
(2)	1 in 10								
(3)	1 in 20								
(4)	1 in 40								
(5)	1 in 80								
(6)	1 in 160								
(7)	1 in 320								
(8)	1 in 640								
(9)	1 in 1280								
(10)	1 in 2560								
(11)	Serum Controls								

In this experiment 10 dilutions of a typhoid extract and 7 dilutions of an antityphoid serum were used. Every dilution of extract was allowed to interact with every dilution of antiserum. Each tube contained 0.5 c.c. of an antiserum dilution, 0.5 c.c. of an extract dilution and 0.5 c.c. fresh guinea-pig serum in a dilution of 1 in 10. After incubation for one hour at 37° C there were added 0.5 c.c. of a 1 in 20 suspension of sheep corpuscles and 0.5 c.c. of a 1 in 400 dilution of haemolytic serum (rabbit v. sheep). The results were read after a second period of incubation for two hours. The extract and antiserum were different from those used in experiment VII.

quantities of extract be added to a constant quantity of antiserum a greatly diluted antiserum appears to be stronger than the one which has been less diluted.

To make an absolute quantitative estimation either of the antibody content of an antiserum or of the antigen content of an extract it is necessary to titrate falling quantities of antiserum with falling quantities of the extract.

If it be desired to determine the complement binding power of any quantity of antiserum, it is essential to mix with it the equivalent amount of extract. When the correct proportions have been determined the amount of complement bound may be estimated, by the use of various amounts of complement. The value of using various amounts of complement as a quantitative method was pointed out by Muir and Martin (1906). The actual complement binding power of any amount of antiserum can, however, only be determined if it is mixed with the correct amount of extract.

#### **On the Cause of the Inhibition of the Reaction by relative Excess of either Antigen or Antibody.**

No theory of the cause of complement-fixation can be considered satisfactory which does not explain the inhibition effects produced by relative excess of either antigen or antibody. It seems rather a difficult matter to interpret these effects on the basis of the amboceptor hypothesis. The only possible explanation is similar to that offered by Neisser and Wechsberg (1901) in their paper on bacteriolysis.

It will be remembered that in their experiments when a large quantity of antiserum was present no bacteriolysis took place. Neisser and Wechsberg put forward the view that under these circumstances the mixture contained a large excess of free amboceptors that is to say amboceptors which had not become attached to the bacilli. They assumed that these free amboceptors took up a large quantity of the complement with the result that there was not sufficient complement for the amboceptors which had attached themselves to the bacilli. It does not seem easy to apply this highly theoretical explanation to the effects shown in Tables VII and VIII. If it is assumed that in this case the complement is deviated by the excess of free amboceptors it is also necessary to assume that the complement is subsequently liberated from the free amboceptors to be taken up by the combination of haemolytic amboceptors and red corpuscles. The

amboceptor hypothesis, moreover, leaves us without any explanation of the inhibition produced by a relative excess of extract.

Now it has been shown that when either antiserum or antigen is present in relative excess precipitation is very greatly delayed. Under these conditions the aggregation process necessary to complement-fixation does not occur, or at any rate, does not occur within the hour allowed for the reaction. The precipitation theory affords a much better explanation of the excess effects than the amboceptor theory. As has been already pointed out, excess of antigen interferes with the fixation of complement in two ways. If the excess is very great no precipitate is formed and no complement fixed. With less quantities of antigen a stage can as a rule be demonstrated in which the precipitation occurs so rapidly that the early stages, during which complement is probably fixed, are passed through too rapidly to permit of effective fixation taking place.

#### The quantitative Estimation of Serum in the Wassermann Reaction (Table IX).

This experiment has been recorded in order to show that excess effects can be demonstrated with a positive syphilitic serum and an extract of syphilitic liver. It will be seen that an accurate quantitative result cannot be obtained either by titrating a constant quantity of extract with falling amounts of serum or by keeping the serum constant and varying the quantities of extract.

The point raised is fairly well shown in Table IX. If a dilution of 1 in 10 extract had been selected as the constant quantity it would have been found that a "complete reaction" could be obtained after the serum had been diluted to 1 in 20. If however, half the quantity of extract had been selected, a practically complete reaction would have been obtained after the serum had been diluted to 1 in 40. It will be seen that the extent to which the serum can be diluted depends on the dose of extract selected.

The table also shows the result of using a constant amount of serum and falling amounts of extract. If we take two dilutions of serum 1 in 5 and 1 in 20 and titrate each quantity with various quantities of the extract, we find that using the 1 in 20 serum dilution the extract can be diluted further than it can be if a 1 in 5 dilution is used.



































If these two dilutions of serum, 1 in 5 and 1 in 20 be taken as representing two separate sera which are to be investigated and if a constant

quantity of each is titrated with falling quantities of extract, it is obvious that an incorrect result will be obtained.

To obtain an accurate quantitative result various quantities of extract must be mixed with various quantities of serum. When the optimal proportions have been ascertained the actual amount of complement fixed can be determined by the use of various quantities of complement.

Apart from the question of attempting to make the Wassermann reaction quantitative it is certainly advantageous at all times to use a series of dilutions. It will be seen from the table that a 1 in 40 dilution of serum gives a marked fixation of complement with an extract dilution of 1 in 20, but only partial fixation with an extract dilution of 1 in 10.

Table IX.

	Dilutions of Syphilitic Serum	Dilutions of Liver Extract				Saline Serum Controls
		1 in 10	1 in 20	1 in 40	1 in 80	
(1)	1 in 5					
(2)	1 in 10					
(3)	1 in 20					
(4)	1 in 40					
(5)	1 in 80					
(6)	1 in 160					
(7)	Saline Extract Controls					

The materials used for this experiment were the serum from a syphilitic patient and an alcoholic extract prepared from the liver of a syphilitic foetus. Each tube (excepting of course the control tubes) contained 0.5 c. c. of diluted extract, 0.5 c. c. of diluted serum and 0.5 c. c. of guinea-pig serum diluted 1 in 10. After one hour's incubation at 37° C there were added 0.5 c. c. of a 1 in 20 suspension of sheep corpuscles and 0.5 c. c. of a 1 in 500 dilution of haemolytic serum. The results were read after a second period of incubation lasting for one hour.

### Experiment X (Table X).

This experiment is similar to those shown in Tables VII and VIII. Seven quantities of typhoid extract and 6 quantities of antityphoid serum were used. The experiment was set up in such a way that every quantity of extract was mixed with every quantity of antiserum. There resulted 42 mixtures each containing different proportions of antigen and antibody.

Each of these mixtures was represented by three tubes each of which received a different dose of complement. A quantitative measure of the amount of complement bound by each of the mixtures was thus attempted. The value of the complement was determined by a separate experiment and the minimal haemolytic dose of the guinea-pig serum was found to be 0.0125 c. c. The method is of course only roughly quantitative for it must not be assumed that 0.025 c. c. has exactly twice the complement value of 0.0125 c. c. of the guinea-pig serum. The method was nevertheless sufficiently accurate to give comparative results of some interest.































































In the first three columns corresponding to the larger amounts of antiserum the quantities of complement used were 0.2 c. c., 0.1 c. c. and 0.05 c. c. In the three last columns corresponding to the smaller amounts of antiserum the amounts of complement were 0.1 c. c., 0.05 c. c. and 0.025 c. c. The experiment was performed in essentially the same way as in the case of the other experiments described in this paper. The extract dilutions were first prepared, the complement was added next and finally the antiserum. After one hour's incubation at 37° C the blood and haemolysin were added. After a further period of incubation (2 hours) the results were read. As in all the other experiments each of the five ingredients was added in a bulk of 0.5 c. c. and the total quantity of fluid in each tube was thus 2.5 c. c.

It will be seen that the larger quantities of extract spontaneously bound the smallest quantity of complement used. The extent to which this spontaneous binding occurred is shown in the extract control column and as a matter of fact, the result of the experiment was not in the least obscured.

Table X a.

Typhoid Extract	Antityphoid Serum.											
	0.0125			0.00625			0.003125			0.0015625		
	0.2	0.1	0.05	0.2	0.1	0.05	0.2	0.1	0.05	0.1	0.05	0.025
(1) 0.1												
(2) 0.05												
(3) 0.025												
(4) 0.0125												
(5) 0.00625												
(6) 0.003125												
(7) 0.0015625												
Serum Control												
(8) 0.5 c. c. Normal Saline												

Table X b.

Antityphoid Serum 0.00078125			Serum 0.000390625			Extract Controls + 0.5 c. c. Normal Saline		Typhoid Extract
Fresh guineapig Serum								
0.1	0.05	0.025	0.1	0.05	0.025	0.05	0.025	
								0.1
								0.05
								0.025
								0.0125
								0.00625
								0.003125
								0.0015625
								

Remarks on Table X. The Relation between the Amount of Antiserum and the Amount of Complement fixed.

This experiment demonstrated once more the importance of optimal proportions of antigen and of antibody.

0.0125	c. c. antiserum bound most complement when	Extract
	mixed with	0.05 c. c.
0.00625	„ idem	0.05 „ or
		0.025 „
0.003125	„ „	0.025 „ or
		0.0125 „
0.0015625	„ „	0.0125 „
0.00078125	„ „	0.00625 „
0.000390625	„ „	0.003125 „

That is to say as the amount of antiserum was diminished the amount of extract necessary to give the best result also diminished. It is, in fact, quite impossible to estimate the antibody content of any given amount of serum unless the correct amount of antigen is used. With the data provided by Table X it is however possible to form a rough estimation of the amount of complement bound by each quantity of antiserum.

By selecting (in Table X) the most effective dose of extract for each quantity of antiserum it is possible to roughly determine the complement bound in each case.

It will be seen that the amount of complement bound is approximately proportional to the amount of antiserum. It is probable that when antiserum and antigen are mixed in the proportions most favourable to complement-fixation that the amount of complement fixed is in proportion to the amount of antiserum. This is in close agreement with the results of the precipitin experiments in which it was shown that the amount of precipitate is in proportion to the amount of antiserum, provided that antigen and antiserum were mixed in equivalent proportions.

#### Discussion of Results.

The evidence for the separate identity of complement binding antibodies and precipitins has been given at some length in the early portion of this paper. There is only need to take up the principal arguments and examine them in relation to the present experiments.

(1) Many instances have been recorded in which there has appeared to be no relation between the amount of precipitate formed and the amount of complement fixed: (a) either a large precipitate has formed and no complement has been fixed, (b) or a slight opalescence has been observed or perhaps no precipitate at all, but complement has been very efficiently fixed.

Now it has been shown that by taking any one antigen and any one antibody and by simply varying their relative proportions it is possible to produce either precipitation without complement-fixation or complement-fixation without precipitation. If the proportions are so adjusted that the precipitate is rapidly formed little or no complement is bound but if the proportions are such that precipitation is slow and incomplete, nothing more than a slight opalescence may appear even after the lapse of hours; complement is nevertheless efficiently fixed. The amount of complement absorbed is



conditioned by two factors, amount of precipitate formed and the rate of its formation. If the precipitate is very rapidly formed no complement is fixed but if the formation of a precipitate is sufficiently slow the amount of complement absorbed is always found to be proportional to the amount of the precipitate. In the case of most antisera it is possible to demonstrate either marked precipitation with little or no complement fixation, or complement fixation with little or no precipitation. Some antisera however are in all dilutions and proportions very slowly precipitated and in these cases the amount of precipitate is always proportional to the amount of complement fixed. The fact that complement-fixation occurs without the formation of a visible precipitate and a bulky precipitate may form without complement being fixed can not be accepted as evidence that the two reactions depend on the existence of two separate antibodies.

(2) Complement fixation can be demonstrated in mixtures which contain so minute a quantity of antigen that no trace of a precipitate can be detected.

That a trace of antigen can be detected by the complement fixation method when no trace of a precipitate can be seen, is almost universally admitted. This fact however, is no evidence that precipitation and complement fixation are independent phenomena. When only a trace of antigen is present the precipitation process is incomplete and extraordinarily slow. Now it has been shown that it is during the very earliest stages of the reaction between antigen and antibody that complement is best fixed. There is indeed reason for thinking (Table II) that the greater part of the complement is fixed during the earliest period of the reaction before even a trace of opalescence makes its appearance.

(3) By heating the antiserum or the antigen containing serum or by merely storing an extract, the power of forming a precipitate is destroyed while the power of binding complement is retained.

A similar explanation to that offered in the last paragraph may reasonably be given. When a bacillary extract is stored away a gradual loss of specific antigen may be supposed to occur. The old extract is no longer able to rapidly produce an obvious precipitate but is only able to slowly and incompletely precipitate the antiserum. These are just the conditions which favour complement fixation. Heat probably acts by altering either antigen or antibody so that precipitation is slower and less complete and consequently favourable to the fixation of complement.

(4) The serum of an animal during the process of immunisation develops complement binding properties earlier than the power of forming a precipitate.

This is exactly the result that might be anticipated. The more delicate reaction, is, as might be supposed, the first to make its appearance. The slight aggregation of particles which follows the mixture of antigen and "weak" antiserum is not sufficient to produce a visible precipitate but can be demonstrated by the complement fixation reaction.

It should also be remembered that the common method of determining the titre of a precipitin serum is to take a constant amount of the antiserum, usually quite a large amount, and to test it with falling quantities of the antigen. For determining the complement binding value of a serum the reverse method is commonly used; that is to say, a constant amount of antigen is mixed with falling quantities of antiserum. In such experiments the result is dependent on the relative proportions of antigen and antibody. If the complement binding and precipitate forming properties are compared, the dilutions, relative proportions and the times allowed for the reactions are usually different. Under such conditions it is not surprising that the complement binding are earlier demonstrable than the precipitating properties or the reverse. The results are dependent on the experimental conditions.

The fact that Chapman and Welsh have been able to prove that the precipitate is derived from the antiserum has an important bearing on the relation between precipitate

formation and complement-fixation. When it was held that the precipitate was derived from the antigen, it was difficult to see how the precipitate obtained from an exceedingly minute trace of antigen could be effective in complement-fixation. Chapman and Welsh have shown that it is the antigen which precipitates the antiserum and that a very minute trace of antigen is able, if sufficient time is allowed, to precipitate a relatively enormous precipitate from the antiserum. The action of the antigen is to induce an aggregation of the molecules of the antiserum and the earlier stages of the process produce the effective conditions for complement fixation. It is probable that the researches of Chapman and Welsh will prove of value in helping to explain the mechanism of other serum reactions.

It has been shown that the greater part of the complement is bound at a very early stage in this aggregation process. Indeed after a visible opalescence has once formed it seems that very little complement is taken up. The fixing of complement is probably an adsorption process for which the optimal conditions are afforded during the earlier stages of precipitation. This view is supported by the results obtained in experiment II.

Chapman and Welsh have shown that the amount of precipitation which can be obtained from any given quantity of antiserum is a constant quantity which is independent of the quantity of antigen which may be present. This result is obtained if sufficient time be allowed for complete precipitation. The rate, however, at which precipitation takes place is closely dependent on the amount of antigen present. If precipitation is interrupted after a few hours the amount of the precipitate formed bears a direct relationship to the amount of antigen present.

In complement-fixation experiments the reaction which takes place in the first hour which follows the mixture of antigen and antibody is alone of importance. If a constant quantity of antiserum be mixed with a series of quantities of antigen, a quantity of antigen can be selected which gives the largest precipitate within the time limit of the experiment.

Such a quantity of antigen may be called the optimal quantity of antigen, because it is the quantity which acts the most rapidly and efficiently on the selected quantity of antiserum. Such quantities of antigen and antiserum may be said to be the optimal proportions for precipitation.

The relation of the amount of complement fixed to the amount of precipitate formed is complicated by the influence of another factor, the rate at which precipitation takes place. The conditions under which complement-fixation takes place are those under which the presence of a relative excess of antiserum produces slow and incomplete precipitation. Provided that the mixture contains a sufficient excess of antiserum, it is true that the amount of complement fixed is proportional to the amount of precipitate formed, but if the proportions are such that precipitation is rapid, then little or no complement is fixed. These experiments offer an explanation of the contradictory results which have been published, for the question as to whether a relation can be demonstrated between the amount of precipitate formed and the amount of complement fixed depends on the relative proportions of antigen and antibody.

The proportions in fact, which favour rapid and complete precipitation are positively unfavourable to complement-fixation. On the other hand there is a definite relation between the proportions most favourable to precipitation and those most favourable to complement fixation. If a constant amount of antiserum be taken, it will, in the majority of cases, be found that the amount of antigen which will produce the best complement-fixation is many times less than the amount necessary to produce the largest precipitate. The reason why the two reactions do not run a parallel course is not because they are caused by two different sets of antibodies, precipitins and amboceptors but because they represent two phases or two stages of the same reaction, and it is not possible to demonstrate both stages under the same conditions. A flocculent precipitate represents the complete and final stage of a change which can be recognised in its earliest and incomplete stage by means of the complement fixation method.

### **Zusammenfassung.**

1) Die schnelle Bildung des größten Niederschlages, welche von einer bestimmten Quantität von Antiserum zu erlangen ist, geschieht nur durch das Mischen entsprechender Mengen von Antigen und Antikörper.

2) Durch Ueberschuß entweder des Antigens oder des Antikörpers wird die Ausflockung wesentlich verlangsamt.

3) Großer Ueberschuß, entweder an Antigen oder an Antikörper, hemmt gänzlich die Ausflockung.

4) Werden Antigen und Antikörper in solchen Mengen vermischt, die schnell einen großen Niederschlag bilden, so wird sehr wenig oder gar kein Komplement gebunden. Unter diesen Umständen steht der Grad der Komplementbindung nicht in Zusammenhang mit der Menge des gebildeten Niederschlages.

5) Mischt man Antigen und Antikörper in solchen Mengen, daß die Trübung etwas langsamer vor sich geht, so erlangt man starke Komplementbindung.

6) Die stärkste Bindung ist nur durch das Mischen bestimmter Mengen von Antigen und Antikörper zu erlangen.

7) Gibt man einer Reihe von verschiedenen Mengen Antigen eine konstante Menge Antikörper zu, so kann man zwei Antigenmengen auswählen. Die eine Menge gibt den größten Niederschlag, die andere die stärkste Komplementbindung. Die Mischung, welche die größte Komplementbindung gibt, enthält gewöhnlich beträchtlich weniger Antigen als die Menge, wodurch der größte Niederschlag entsteht.

8) Bei einem Ueberschuß entweder an Antigen oder an Antikörper wird weniger Komplement gebunden. Eine etwas größere als für die Komplementbindung optimale Menge des Antigens beschleunigt die Ausflockung, aber vermindert den Grad der Komplementbindung. Die Bildung des Niederschlages wird durch noch größere Mengen des Antigens auch gehemmt. Ist jedoch die Menge Antigen kleiner als die, welche die beste Komplementbindung gibt, so entsteht eine Verminderung nicht nur im gebundenen Komplement, sondern auch in der Quantität des Niederschlages. Bei weiterer Ver-

minderung des Antigens werden beide Reaktionen schwächer, bis eine Verdünnung erreicht wird, wobei Trübung nicht mehr sichtbar ist, während etwas Komplement noch gebunden wird.

9) Bei einem Gemisch, worin der Niederschlag sich wegen relativem Ueberschuß an Antikörper nicht zu schnell zeigt, stehen der Grad der Komplementbindung und die Menge des Präzipitums im engsten Zusammenhang.

10) Vorausgesetzt, daß Antiserum und Antigen in optimalen Quantitäten gemischt werden, entspricht der Grad der Komplementbindung den Mengen des anwesenden Antiserums.

11) Wo unvollkommene Ausflockung durch relativen Ueberschuß an Antigen verursacht wird, bleibt die Komplementbindung stets aus.

12) Komplementbindung geschieht wahrscheinlich während der frühesten Stadien der zusammenballenden Wirkung, wodurch ein sichtbarer Niederschlag sich bildet. Nachdem die Trübung sichtbar geworden ist, wird sehr wenig Komplement gebunden. Wo relativer Ueberschuß an Antiserum ist, ist die Ausflockung langsam und unvollkommen, und unter diesen Umständen halten sich die früheren Stadien lange genug, um Komplement zu binden.

13) Um die möglichst größte Bindung zu erlangen, sollte das Komplement vom Augenblick an, wo das Antigen mit dem Antikörper gemischt wird, anwesend sein. Läßt man Zeit vergehen, bevor man das Komplement einem Gemisch von Antigen und Antikörper zugibt, so findet entschieden weniger Bindung statt.

14) Die Tatsache, daß Ausflockung ohne Komplementbindung geschieht, ist absolut kein Beweis, daß die Präzipitine vom komplementbindenden Antikörper verschieden seien, denn es ist möglich, bei der Zugabe zweier verschiedenen Mengen des einen Antigens einer konstanten Menge des einen Antiserums, Ausflockung ohne Komplementbindung, oder Komplementbindung ohne Ausflockung, zu erlangen.

15) Komplementbindung und Ausflockung sind zwei Methoden, wodurch wir denselben Vorgang beobachten können, nämlich die Zusammenballung der Partikelchen eines Antiserums durch das homologe Antigen.

16) Bedient man sich der Komplementbindungsmethode, um Antigen zu entdecken, so muß man verschiedene Verdünnungen des Antiserums gebrauchen. Wenn nicht eine ungefähr zweckentsprechende Menge des Antiserums gebraucht wird, ist es immer möglich, daß die Komplementbindung durch einen relativen Ueberschuß entweder an Antigen oder an Antiserum verdeckt wird. Daraus ergibt sich, daß, um eine äußerst minimale Menge Antigen zu entdecken, man eine kleine und keine große Menge Antiserum nehmen muß.

17) Um Antigen oder Antikörper quantitativ zu bestimmen, muß man mehrere Mengen Antigen mit mehreren Mengen Antikörper titrieren, denn nur wenn man Antigen und Antikörper in zweckentsprechenden Mengen mischt, erzielt man die maximale Komplementbindung. Nachdem die zweckentsprechenden Mengen Antigen und Antikörper gefunden worden sind, kann man die genaue Menge des gebundenen Komplements durch den Gebrauch verschiedener Mengen des Meerschweinchenserums, dessen Komplementinhalt vorher bestimmt worden ist, feststellen.

18) Will man zwischen nahe verwandten Bakterienrassen oder den Sera nahe verwandter Tiere unterscheiden, so paßt die Komplementbindungsmethode zu diesem Zweck besser als die Präzipitierungsmethode. Vollständige Differenzierung erzielt man oftmals nur durch eine Verdünnung des Antiserums, die zu schwach ist, sichtbare Trübung hervorzurufen. Klare Differenzierung erzielt man auch durch den Gebrauch verschiedener Mengen des Komplements.

#### Bibliography.

- Altmann, K., *Centralbl. f. Bakt., Abt. I, Orig.*, Bd. 54, 1910, No. 2, p. 174.  
 Bordet et Gengou, *Annales de l'Institut Pasteur*, Vol. 15, 1901, No. 5, p. 289.  
 Chapman, H. G., *Proc. of the Royal Society, Series B*, Vol. 82, 1910, p. 398.  
 Dean, H. R., *Proc. of the Royal Society of Medicine, Pathological Section*, 1911, Vol. 4, No. 6, p. 251.  
 Friedberger, E., *Deutsche med. Wochenschr.*, 1906, No. 15, p. 578.  
 Gay, F. P., *Annales de l'Institut Pasteur*, Vol. 19, 1905, No. 10, p. 593.  
 — *Centralbl. f. Bakt., Abt. I, Orig.*, Bd. 39, 1905, No. 5, p. 603.

- Gengou, O., *Annales de l'Institut Pasteur*, Vol. 16, 1902, p. 734.  
 Klein, A., *Wiener klin. Wochenschr.*, 1905, No. 48, p. 1261.  
 Liefmann, H., *Berliner klin. Wochenschr.*, 1906, No. 15, p. 448.  
 Meier, G., *Jahresbericht über Ergebnisse der Immunitätsforschung* (Weichardt), Bd. 4, Stuttgart 1909, p. 58.  
 Muir, R., und Martin, W. B. M., *Journ. of Hygiene*, Vol. 6, 1906, p. 265.  
 Moreschi, C., *Centralbl. f. Bakt., Abt. I, Referate*, Bd. 38, 1906, Beiheft, p. 96.  
 — *Berliner klin. Wochenschr.*, 1906, No. 4, p. 100.  
 Neisser, M., und Sachs, H., *Berliner klin. Wochenschr.*, 1905, No. 44, p. 1388.  
 — — *Berliner klin. Wochenschr.*, 1906, No. 3, p. 67.  
 — und Wechsberg, *Münchener med. Wochenschr.*, Bd. 48, 1901, p. 697.  
 Pfeiffer, R., und Moreschi, C., *Berliner klin. Wochenschr.*, 1906, No. 2, p. 35.  
 Sachs, H., und Altmann, K., *Komplementbindung. Handbuch der pathogenen Mikroorganismen* (Kolle und Wassermann), *Ergänzungsband 2*, 1909, p. 476.  
 Sobernheim, G., *Centralbl. f. Bakt., Abt. I, Referate*, Bd. 38, 1906, Beiheft, p. 115.  
 Wassermann und Bruck, *Med. Klinik*, 1905, No. 55, p. 1409.  
 Welsh, D. A., and Chapman, H. G., *Proc. of the Royal Society*, Vol. 78, 1906, Series B, p. 297.  
 — *Proc. of the Royal Society*, Vol. 80, 1908, Series B, p. 161.  
 — *Zeitschr. f. Immunitätsforsch., Orig.*, Bd. 9, 1911, No. 4, p. 517.  
 Widai and Le Sourd, *Comptes rend. hebdom. des seances et Memoires de la Société de Biologie*, Vol. 53, 1901, p. 841.



*Nachdruck verboten.*

## **Ueber das Anaphylatoxin Friedbergers.**

Von Dr. H. Ströbel.

(Eingegangen bei der Redaktion am 11. März 1912.)

In einer Publikation aus dem Friedbergerschen Laboratorium, die unter dem Titel: „Gelingt es, durch inaktiviertes Meerschweinchenserum ein akut tötendes Anaphylatoxin aus Bakterien abzuspalten?“ von Dr. Angelo Lurà in Bd. 12, Heft 4 dieser Zeitschrift erschienen ist, finde ich unter anderen auch Besredka und mich als Gewährsmann für das Friedbergersche Anaphylatoxin angeführt. Da ich nach meinen Versuchen, die ich unter Prof. Besredkas Leitung im Pariser Pasteurschen Institut ausgeführt habe und deren Veröffentlichung in einer deutschen Zeitschrift beabsichtigt ist, das Friedbergersche Anaphylatoxin und die darauf aufgebaute Theorie der Infektionskrankheiten nicht anerkennen kann, so sehe ich mich veranlaßt, kurz den Inhalt der offenbar mißverstandenen Veröffentlichungen hier wiederzugeben.

Es gelang uns ohne weiteres, aus Bakterien (Typhus, Meningokokken, Diphtherie) das von Friedberger als Anaphylatoxin bezeichnete giftige Produkt darzustellen, dasselbe Produkt erhielten wir jedoch auch, wenn wir sterile Agarröhrchen mit Alexin digerierten. Durch eingehende Versuche ermittelten wir das im Nährboden enthaltene Pepton als Grundlage für das Gift, das wir als Peptotoxin bezeichneten, weil uns die Bezeichnung desselben als Anaphylatoxin keineswegs begründet schien. Betreffs der Einzelheiten muß ich auf die Originalmitteilungen in den Comptes rendus de la Soc. de Biologie, T. 71, p. 413, 599 und 691 verweisen; ich beschränke mich hier darauf, unseren Schlußsatz wiederzugeben: De l'ensemble de ces expériences, il résulte que les accidents si graves, relèvent d'un produit plus ou moins dégradé de la peptone, que nous avons appelé, en attendant de plus amples renseignements, peptotoxine.

### Bemerkung zu vorstehenden Ausführungen.

Von Dr. **Angelo Lurà**, z. Z. Bergamo.

In der in Frage stehenden Publikation von Besredka und Ströbel (Compt. rend. de la Soc. de Biol., T. 71, p. 413) findet sich folgendes Zitat:

„L'anaphylatoxine typhique a été préparée d'après le procédé simplifié indiqué par son auteur.

---

En opérant ainsi nous avons pu confirmer pleinement les faits avancés par Friedberger et ses élèves au sujet de la toxicité du produit<sup>1)</sup>: tous nos cobayes (200—215 gr.) succombaient à la dose de 2.5 cent. cubes en deux-trois minutes au milieu des phénomènes rappelant le choc anaphylactique; les animaux injectés avec de l'anaphylatoxine préparée au moyen du sérum inactivé (56 degrés  $\frac{1}{2}$ , heure) de cobaye restaient sains et saufs; il en était de même lorsqu'on injectait aux cobayes de l'anaphylatoxine préparée dans des conditions requises, mais après l'avoir chauffée à 65 degrés pendant une demi-heure.“

Dies kann nicht anders denn als eine vollkommene Bestätigung der **tatsächlichen Angaben** von Friedberger aufgefaßt werden. Das, was hier Ströbel noch einmal besonders hervorhebt, nämlich daß die beiden Autoren die **Erklärung** der von Friedberger und seinen Schülern gefundenen Tatsachen nicht anerkennen, habe ich ja ausdrücklich in meiner jüngsten Arbeit (in Heft 6, Bd. 12 dieser Zeitschrift) betont<sup>2)</sup>, so daß mir der Zweck der Ströbelschen Ausführungen nicht ersichtlich ist.

---

1) Im Original nicht gesperrt.

2) Die tatsächlichen Einwendungen sind übrigens durch unsere Versuche der Anaphylatoxinabspaltung aus auf peptonfreien Nährböden gewachsenen Bakterien, durch die Versuche von Friedberger und Szymanowski sowie Marcora mit Trypanosomen aus dem Organismus widerlegt. In neuerer Zeit haben auch Friedberger und Joachimoglu Anaphylatoxin aus Tuberkelbacillen von albumosenfreien Nährböden (Höchst) erhalten (Berliner Mikrobiologische Gesellschaft, Sitzung vom 28. März 1912).

*Nachdruck verboten.*

**Zu meiner Arbeit „Studien über Immunität und Zellzerfall“.**

(Diese Zeitschrift, Bd. 12, 1912, Heft 5.)

Von **G. Kapsenberg**, Leiden.

(Eingegangen bei der Redaktion am 21. März 1912.)

Herr Prof. H. Pfeiffer hatte die Freundlichkeit, mich auf eine Arbeit von Hertle und ihm in dieser Zeitschrift (Bd. 10, Heft 5/6), welche von mir nicht erörtert wurde, aufmerksam zu machen.

Durch äußere Umstände waren mir einzelne Hefte dieser Zeitschrift nicht zugänglich, so daß mir die Arbeit von Hertle und Pfeiffer zu meinem Bedauern unbekannt war.

Hertle und Pfeiffer haben festgestellt, daß, wenn man beim Meerschweinchen eine Niere zertrümmert, die Wiedereinspritzung von artgleicher Nierenemulsion — 30 Tage nach der Nierenzertrümmerung — beträchtliche Grade von Ueberempfindlichkeit sehen läßt.

Ich möchte dies eine „Iso“-Anaphylaxie nennen, welche also zum ersten Male von den genannten Untersuchern festgestellt worden ist.

Ich habe aber, unbekannt mit dieser Arbeit, beim Kaninchen u. a. festgestellt:

1) Daß die Möglichkeit nicht ganz ausgeschlossen ist, daß beim Zerfall der eigenen Blutkörperchen anaphylaktische Erscheinungen gegenüber den eigenen Blutkörperchen auftreten (Kaninchen I, Aqua dest., p. 514).

2) Daß ganz gewiß beim Zerfall der eigenen Leberzellen (z. B. Kaninchen fol. 22, p. 516) und wahrscheinlich auch beim Zerfall der eigenen Nierenzellen (Kaninchen fol. 15, p. 518) anaphylaktische Erscheinungen auftreten, wenn man die eigenen Leberzellen bzw. die eigenen Nierenzellen reinjiziert, und zwar schon innerhalb 1 bis 2 Tagen, nachdem der Zellzerfall stattgefunden hat.

Ich möchte dies „Auto“-Anaphylaxie nennen. Diese Befunde sind meines Wissens ganz neu.

Sie sind nicht ohne Belang, da es doch möglich, obwohl nicht wahrscheinlich war (z. B. als eine Aeüßerung der internen Regulation), daß die Reaktionskörper, welche beim Zerfall eigener Zellen auftreten, wohl mit artgleichen, aber nicht mit körpereigenen Zellen reagierten. Umgekehrt aber kann das Auftreten der anaphylaktischen Erscheinungen bei der Reinjektion eigener Zellen auch als Beweis dafür angeführt werden, daß die Antikörper wirklich durch das Zugrundegehen der eigenen Zellen in die Zirkulation übergetreten sind.

Zugleich möchte ich diese Gelegenheit ergreifen, ein Versehen richtig zu stellen. Die Arbeit Halperns (Zeitschr. f. Immunitätsf., Orig., Bd. 11, Heft 5) habe ich unter die Arbeiten, welche nicht zwingend Autocytotoxine festgestellt haben, angeführt (siehe Fußnote p. 481).

Da aber Halpern bei seinen Komplementbindungsversuchen auch dieselbe Nierenemulsion verwendete, welche er beim Tiere einverleibt hatte, so muß die Arbeit ohne Zweifel zu denen gerechnet werden, welche sich mit „echten“ Autocytotoxinen beschäftigt haben.

## **Zeitschrift f. Immunitätsforschung. Originala. Bd. XIII. No. 2.**

*Nachdruck verboten.*

[Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin;  
Direktor: Geheimrat Prof. Dr. A. Heffter (Abteilung für Im-  
munitätsforschung und experimentelle Therapie, Leiter: Prof.  
Dr. E. Friedberger).]

### **Ueber hämolytische und bakterienabtötende Wirkung chemisch indifferenten und unlöslicher anorganischer kolloidaler Substanzen <sup>1)</sup>.**

Von **E. Friedberger** und **Taiso Kumagai** aus Tokio.

(Eingegangen bei der Redaktion am 13. Januar 1912.)

Die Versuche, über die im nachstehenden berichtet werden soll, gehen auf eine zufällige Beobachtung zurück. In einer voraufgegangenen Arbeit mit Salecker war gezeigt worden, daß Kaolin aus unverdünntem Serum keinen Ambozeptor, wohl aber das Komplement quantitativ adsorbiert.

Wir glaubten mittelst dieser Methode zur Trennung von Ambozeptor und Komplement ein Verfahren ausarbeiten zu können, um das Komplement möglichst rein zu erhalten.

Wir versuchten zu dem Zweck auf die verschiedenste Weise von dem mit Normalserum in Kontakt gewesenen Kaolin das Komplement wieder abzuspalten und eine Lösung zu erhalten, die ambozeptorbeladene Blutkörperchen hämolytiert. Diese Versuche haben jedoch bisher noch zu keinem positiven Resultat geführt.

Immerhin beobachteten wir anfangs bei derartigen Versuchen wiederholt, daß das mit Komplementserum in Kontakt gewesene Kaolin selbst ambozeptorbeladene Blutkörperchen auflösen vermochte und wir dachten schon, daß auf diese Weise das verankerte Komplement durch die beladenen Blutkörperchen abgetrennt würde. Auffallenderweise aber trat die Hämolyse nur dann deutlich ein, wenn das Kaolin mit ver-

---

1) Die Resultate wurden vorgetragen und entsprechende Versuche demonstriert in der I. Sitzung der Berliner Mikrobiologischen Gesellschaft (November 1911).

dünntem Komplementserum in Kontakt gewesen war, und um so deutlicher, je stärkere Verdünnungen des zur Adsorption benutzten Komplementserums angewandt wurden.

Dieses scheinbar so paradoxe Verhalten veranlaßte uns, einmal den Einfluß des frischen Kaolins auf gewaschene native rote Blutkörperchen zu untersuchen. Zunächst dachten wir gar nicht daran, daß das Kaolin an sich irgendwie hämolytisch wirken könnte, denn alle bekannten chemischen Hämolysine sind ja wasserlöslich. Hier aber haben wir eine völlig unlösliche, chemisch indifferente Substanz. Zu unserer größten Ueberraschung trat jedoch bei Zusatz gewisser Mengen von Kaolin zu gewaschenen roten Blutkörperchen komplette Hämolysen in relativ kurzer Zeit ein, während Serumzusatz die Reaktion hemmte<sup>1)</sup>.

Mit diesen Versuchen war eine Erklärung gegeben für die eben besprochene Beobachtung, wonach vorher mit verdünntem Komplementserum in Kontakt gewesenes Kaolin, nicht aber das mit konzentriertem Serum behandelte, ambozeptorbeladene Blutkörperchen löste.

Es handelt sich hier eben um eine primäre hämolytische Wirkung des Kaolins bzw. um eine Hemmung dieser Hämolysen durch Serum, und die vorherige Beladung der Blutkörperchen war völlig indifferent.

Wir haben nun über diese eigentümliche Form der Hämolysen nähere Versuche angestellt.

Wir haben den Einfluß des Kaolins auf gewaschene Blutkörperchen vom Hund, Hammel, Pferd, Schwein, Rind, Ziege, Mensch, Taube und Frosch in 5-proz. Aufschwemmung untersucht, und fanden, daß alle diese Blutkörperchen gelöst werden.

Wir haben also hier eine allgemeine Hämolysen, wie wir sie auch bei den chemischen Mitteln kennen, im Gegensatz zur elektiven Hämolysen, wie sie durch hämolytische Eiweißkörper pflanzlichen oder tierischen Ursprungs hervorgerufen wird.

---

1) Nach Abschluß unserer Arbeit erfahren wir, daß Gengou nach einem Vortrage von Roux in der Académie des Sciences (T. 138, 1906) in Paris über die hämolytische und agglutinierende Wirkung des Bariumsulfats und Fluorcalciums, sowie über die hemmende Wirkung des Serums (Eiweißes) und über die Thermostabilität kurz berichtet hat. Der Autor sah auch bereits, daß das hemmende Prinzip dem Serum entzogen wird.

Nachstehende Tabelle zeigt den Grad der hämolytischen Wirkung des Kaolins auf verschiedene Blutarten. Die Ablesung erfolgte stets nach 2-stündigem Aufenthalt im Brutschrank bei 37°, doch sei schon hier hervorgehoben, daß namentlich bei den stärkeren Kaolinkonzentrationen die Hämolyse auch bei Zimmertemperatur schon innerhalb von 15 Minuten beendet ist. Es wurde in diesen Versuchen, sowie in allen nachstehenden eine 5-proz. Aufschwemmung 3mal gewaschener Blutkörperchen benutzt, zu der die angegebenen abgewogenen Kaolinmengen, ausgehend von einer 20-proz. Aufschwemmung, in je 1 ccm physiologischer Kochsalzlösung zugesetzt wurden.

Tabelle I.  
Kaolinhämolyse mit verschiedenen Blutarten.

Menge der 20-proz. Kao- linemulsion	phys. NaCl- lösg.	Menge der 5-proz. Blut- körperchen- aufschwem- mung	Hämolyse mit Blut von			
			Pferd	Hammel	Rind	Schwein
1.0	0,0	1,0	komplett	komplett	komplett	komplett
0.8	0.2	"	fast komplett	"	"	"
0.6	0.4	"	stark, Hauch	"	"	"
0.4	0.6	"	"	fast komplett	stark, Hauch	"
0.2	0.8	"	wenig, Kuppe	"	"	fast komplett
0.1	0.9	"	"	stark, Hauch	"	stark, Hauch
0.08	0.92	"	Spur	mäßig, Kuppe	"	"
0.06	0.94	"	ø	wenig, Kuppe	mäßig, Kuppe	mäßig, Kuppe
0.04	0.96	"	ø	Spur	wenig, Kuppe	"
0.02	0.98	"	ø	ø	Spur	wenig Kuppe
0,0	1,0	"	ø	ø	ø	ø

Nach dem Zusatz der Kaolinaufschwemmung wurde einmal geschüttelt, dann aber das Schütteln nicht wiederholt. Das Kaolin sinkt dann zum Teil sehr schnell zu Boden, noch ehe eine Hämolyse sichtbar ist. Diese beginnt nun allmählich an der Grenze zwischen Kaolinschicht und Blutkörperchenaufschwemmung, und geht von da allmählich nach oben, bis die Blutkörperchen vollkommen gelöst sind, und das klare lackfarbene Blut über der Kaolinschicht steht.

In den Röhrchen mit inkompletter Hämolyse sieht man deutlich die zunehmenden Kuppen der Blutkörperchen über der Kaolinschicht stehen, und kann danach und nach der geringeren Färbung der obenstehenden Flüssigkeit den Grad

der Hämolyse genau so gut bestimmen, wie bei dem gewöhnlichen Reagenzglasphänomen.

In Anbetracht des Umstandes, daß das Kaolin ja vollkommen unlöslich und chemisch indifferent ist, dachten wir zunächst daran, daß hier eine sekundäre Beimengung zu der Substanz für die Hämolyse verantwortlich zu machen sei. Unsere ersten Versuche waren mit einem von Merck bezogenen Präparat angestellt worden. Wir benutzten dann noch das Kaolin von Kahlbaum und sein Präparat unbekannter Herkunft. Mit allen dreien waren jedoch die Resultate dieselben. Auch Auswaschen sowie  $\frac{1}{2}$ -stündiges Glühen änderte nicht die hämolytische Fähigkeit. Die Prüfung der Reaktion von mit Kaolin lange Zeit geschütteltem destillierten Wasser war neutral. Nach Kochen des Kaolins mit Säure und Alkali und nachheriger Auswaschung bis zur neutralen Reaktion war gleichfalls die hämolytische Kraft unverändert geblieben.

Wir dachten dann an die Möglichkeit, daß vielleicht durch das Kaolin die Salzkonzentration der Blutkörperchenaufschwemmung eine Aenderung erfahren könnte, d. h. Hypotonie und dadurch Hämolyse entstehen könnte.

Die Titrierung der mit Kaolin in Kontakt gewesenen physiologischen Kochsalzlösung nach Vollhard ergab jedoch keinen Anhaltspunkt für eine Verminderung des Salzgehaltes. Dazu kommt noch, wie weiter unten ausführlich gezeigt werden wird, daß die Hämolyse auch in gleicher Weise eintritt bei Verwendung von 10-fach hypertonischer physiologischer Kochsalzlösung. Wir kommen also auf Grund aller dieser Kontrollversuche zu dem notwendigen Schluß, daß die Hämolyse durch das Kaolin selbst bedingt ist.

Wie kommt nun diese Hämolyse durch eine an sich unlösliche Substanz zustande?

Wir haben schon oben darauf hingewiesen, daß durch die Gegenwart von Serum die Blutkörperchen vor der Kaolin-hämolyse geschützt werden. Das legte uns den Gedanken nahe, daß vielleicht hier ein ähnlicher Mechanismus eine Rolle spielt, wie ihn Ransom und Meier für die Saponinhämolyse aufgedeckt haben. Hier ist es das Cholestearin der roten Blutkörperchen, welches, mit dem Saponin sich verbindend,



die Hämolyse bewirkt, während die gleichzeitige Gegenwart von Serum zur Folge hat, daß sich das Saponin zuerst mit dem Cholestearin des Serums absättigt und dadurch von den Blutkörperchen ferngehalten wird.

Zur Entscheidung dieser Frage haben wir zunächst Untersuchungen angestellt über einen eventuellen hemmenden Einfluß des Cholestearins auf die Kaolin-hämolyse. Es wurde in diesen Versuchen ein von uns durch mehrmaliges Kristallisieren aus heißem Alkohol gereinigtes Cholestearin benutzt.

Vom Cholestearin, das sich sehr nur schwer gleichmäßig in Wasser emulgieren läßt, konnten wir nur eine 0,3-proz. Emulsion nach dem Verfahren von Porges und Neubauer wie folgt herstellen.

0,3 Cholestearin wird in Aceton gelöst. Diese Lösung wird tropfenweise in 100 ccm destillierten Wassers gebracht, wobei eine einigermaßen gleichmäßige Emulsion zustande kommt.

Das Aceton wird bei 40–50° im Wasserbad verjagt. Den Einfluß des Cholestearins auf die Kaolin-hämolyse zeigt die folgende Tabelle. Zunächst wurden in einem Versuche konstante, komplett lösende Dosen von Kaolin mit fallenden Mengen von Cholestearin beladen.

#### Einfluß des Cholestearins auf die Kaolin-hämolyse.

Je 1 ccm 20-proz. Kaolinemulsion wird mit der aus der Tabelle ersichtlichen fallenden Menge von Cholestearin versetzt; 1 Stunde 37°; zentrifugieren; zu den Bodensätzen je 1 ccm 5-proz. Hammelblutaufschwemmung.

Ablesung nach 2-stündigem Aufenthalt bei 37°.

Tabelle II.  
Hemmung der Kaolin-hämolyse durch Cholestearin.

20-proz. Kaolinemulsion	0,3-proz. Cholestearin- emulsion	Cholestearin- gehalt	Hämolyse
1,0	1,0	0,003	komplett
1,0	$\frac{1}{2}$	0,0015	"
1,0	$\frac{1}{4}$	0,0033	"
1,0	$\frac{1}{8}$	0,0017	"
1,0	$\frac{1}{16}$	0,0009	"
1,0	$\frac{1}{32}$	0,0004	"
1,0	$\frac{1}{64}$	0,0002	"
1,0	$\frac{1}{128}$	0,0001	"
1,0	$\frac{1}{256}$	0,0000	"
1,0	$\frac{1}{512}$	0,00005	"
1,0	$\frac{1}{1024}$	0,000025	"

In dem folgenden Versuch werden fallende Mengen von Kaolin einmal mit physiologischer Kochsalzlösung, das andere Mal mit je 1 ccm 3-proz. Cholestearinaufschwemmung versetzt. Beide Serien blieben wie oben 1 Stunde bei 37°. Dann wurde zentrifugiert. Die Kaolinbodensätze wurden mit je 1 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und je mit 1 ccm 5-proz. Hammelblut versetzt.

Ablesung der Hämolyse wiederum nach 2 Stunden Brutschranktemperatur.

Tabelle III.

Menge der 20-proz. Kaolin- emulsion	Kaolin in g	0,3-proz. Cholestearin- emulsion	Cholestea- rin in g	Hämolyse	
				mit Cholestearin	ohne Cholestearin
1,0	0,2	1,0	0,003	komplett	komplett
0,8	0,16	1,0	0,003	"	"
0,6	0,12	1,0	0,003	"	"
0,4	0,08	1,0	0,003	"	"
0,2	0,04	1,0	0,003	stark	stark
0,1	0,02	1,0	0,003	wenig	wenig
0,08	0,016	1,0	0,003	"	"
0,06	0,012	1,0	0,003	Spur	Spur
0,04	0,008	1,0	0,003	θ	θ
0,02	0,004	1,0	0,003	θ	θ

Aus den beiden vorstehenden Tabellen ergibt es sich, daß das Cholestearin die Kaolinhämolyse selbst in großen Dosen auch nicht spurenweise zu hemmen imstande ist. Danach ist jedenfalls bei der Kaolinhämolyse der Mechanismus der Serumhemmung ein anderer als bei der Saponinhämolyse.

Wir haben nun eine Reihe weiterer Versuche angestellt, um die Ursache der hemmenden Wirkung des Serums auf die Kaolinhämolyse zu studieren. Zunächst untersuchten wir, ob ein Unterschied zwischen aktivem und inaktivem Serum nach dieser Richtung besteht. Das ist jedoch nicht der Fall.

Um zu sehen, ob die verschiedenen Serumarten verschiedenes Hemmungsvermögen auf Kaolinhämolyse besitzen, wurden die folgenden Versuche angestellt.

Tabelle IV.

Bei diesem Versuche wurde das Hemmungsvermögen verschiedener Sera auf Kaolinhämolyse von arteigenen Blutkörperchen untersucht.

20-proz. Emulsion von Kaolin (Kahlbaum).

5-proz. Blutkörperchenaufschwemmung von Meerschweinchen, Hammel, Schwein, Rind und Pferd.

Seren von diesen Tieren. Methode wie üblich.

Menge des Serums von →	Hämolyse mit Blut von				
	Hammel	Meerschw.	Schwein	Rind	Pferd
0,5	θ	θ	θ	θ	θ
0,4	θ	θ	θ	θ	θ
0,3	θ	θ	θ	θ	θ
0,2	θ	θ	θ	θ	θ
0,1	Spur	fast θ	θ	θ	θ
0,05	wenig	Spur	θ	θ	θ
0,04	mäßig	wenig	θ	θ	θ
0,03	stark	mäßig	wenig	θ	θ
0,02	komplett	stark	mäßig	θ	θ
0,01	„	komplett	stark	stark	stark

Man sieht aus den Tabellen, wie verschieden das hemmende Vermögen der einzelnen Sera auf die Kaolin-hämolyse ist.

Tabelle V.

Bei diesem Versuch wurden Sera von Meerschweinchen, Hammel, Rind, Schwein und Pferd benutzt. Von Blut nahmen wir nur das des Hammels. Methodik wie üblich.

Menge des Serums	Hämolyse mit				
	Hammel-serum	Meerschweinchen-serum	Rinder-serum	Schweine-serum	Pferde-serum
0,5	θ	θ	θ	θ	θ
0,4	θ	θ	θ	θ	θ
0,3	θ	θ	θ	θ	θ
0,2	θ	θ	θ	θ	θ
0,1	Spur	fast θ	θ	θ	θ
0,05	mäßig	Spur	fast θ	fast θ	θ
0,04	„	wenig	Spur	Spur	Spur
0,03	„	„	wenig	wenig	„
0,02	stark	mäßig	„	„	wenig
0,01	komplett	fast komplett	stark	stark	mäßig

Ferner untersuchten wir, ob das hämolysehemmende Vermögen des Serums der Albuminfraktion oder der Globulinfraktion desselben zuzuschreiben sei.

#### Hemmung der Kaolin-hämolyse durch Globulin und Albumin des Serums.

A. 25 ccm Hammelserum wurden mit gleichem Volumen abgesättigter Lösung von Ammoniumsulfat versetzt. Filtrieren. Rückstand wurde in Aq. dest. aufgelöst, 48 Stunden dialysiert, dann auf 25 ccm im Faustschen Apparat kondensiert, mit 0,22 g NaCl isotonisch gemacht.

B. Filtrat von A mit fein pulverisiertem Ammoniumsulfat gesättigt, filtriert, Rückstand in Aq. dest. aufgelöst, dialysiert. Bis zum früheren Volumen im Faustschen Apparat kondensiert, mit 0,22 g NaCl isotonisch gemacht.

Das ursprüngliche Serum war zum Teil im Frigo aufbewahrt. Mit diesen 3 Quoten Hemmungsversuche wie üblich.

Tabelle VI.

Menge der Präparate	Hämolyse mit		
	nativem Serum	Albumin- fraktion	Globulin- fraktion
1	0	0	0
1/2	0	0	0
1/4	0	mäßig	0
1/8	0	stark	Spur
1/16	Spur	komplett	mäßig
1/32	mäßig	0	stark
1/64	stark	0	komplett
1/128	komplett	0	"
1/256	"	0	"
1/512	"	0	"

Man sieht also, daß sowohl die Serumalbuminfraktion wie auch die Globulinfraktion auf die Kaolin-hämolyse hemmend wirkt, und zwar die letztere etwas stärker als die erstere.

Stärker noch als die hemmende Wirkung des Serums ist übrigens die von Eiereiweiß und in gleichem Grade die von Eigelb. Schon der Umstand, daß das an Lipoiden so reiche Eigelb nicht stärker hemmend wirkt, als das Eiweiß, scheint gegen eine Beteiligung derartiger Substanzen bei der hemmenden Wirkung zu sprechen.

Das Resultat eines Versuches mit Eiweiß und dem Eigelb des gleichen Eies zeigt die folgende Tabelle VII.

Tabelle VII.

Die hämolysehemmende Wirkung von Eiweiß und Eigelb.

Versuchsordnung wie in Tabelle IV.

Menge des Eiweißes	20-proz. Kaolin	5-proz. Hammel- blut	Eier- eiweiß	Eigelb
0,5	1,0	1,0	0	0
0,25	"	"	0	0
0,1	"	"	0	0
0,05	"	"	0	0
0,01	"	"	0	0
0,005	"	"	Spur	Spur
0,001	"	"	stark	stark
0,0005	"	"	"	"
0,0001	"	"	"	"
0,00005	"	"	komplett	komplett
0,00001	"	"	"	"
0,0	"	"	"	"

Nun war fernerhin zu untersuchen, inwieweit die dem Eiweiß eigentümliche hemmende Wirkung auch den Abbauprodukten zukommt. Zunächst prüften wir die hemmende Kraft von Albumosen.

Tabelle VIII.

Hemmung der Kaolinhämolysen durch Albumosen.

Die benutzten Präparate wurden seinerzeit von Dr. S. Mita für andere Versuche auf folgende Weise bereitet:

Pepton Witte zu 5 Proz. durch Erhitzen in Aq. dest. aufgelöst, erkalten lassen.

Filtrat mit gleichem Teil von gesättigter Ammoniumsulfatlösung versetzt. Niederschlag abfiltriert, dialysiert = primäre Albumose.

Filtrat wurde wiederum mit  $\frac{1}{2}$  Teil der gesättigten Lösung von Ammoniumsulfat versetzt, also zu  $\frac{2}{3}$  gesättigt, filtriert. Niederschlag dialysiert = Deuteroalbumose  $\alpha$ .

Filtrat mit fein pulverisiertem Ammoniumsulfat gesättigt. Rückstand dialysiert = Deuteroalbumose  $\beta$ .

Filtrat mit  $\frac{1}{10}$  Volumen der mit Ammoniumsulfat gesättigten  $\frac{1}{10}$  Normalschwefelsäure versetzt, filtriert. Rückstand dialysiert = Deuteroalbumose  $\gamma$ .

Mit diesen 4 Präparaten wurde die Hemmung der Hämolysen untersucht. Zu 5 Proz. in physiologischer NaCl-Lösung aufgelöst.

Methode wie üblich.

Menge der 5-proz. Lösung	Substanz in g	Hämolysen mit			
		primäre Albumose	Deutero- albumose $\alpha$	Deutero- albumose $\beta$	Deutero- albumose $\gamma$
1	0,05	0	0	0	0
$\frac{1}{2}$	0,025	0	0	0	0
$\frac{1}{4}$	0,0125	0	0	0	Spur
$\frac{1}{8}$	0,0063	0	0	Spur	mäßig
$\frac{1}{16}$	0,0032	0	0	mäßig	komplett
$\frac{1}{32}$	0,0016	mäßig	mäßig	stark	"
$\frac{1}{64}$	0,0008	stark	stark	komplett	"
$\frac{1}{128}$	0,0004	komplett	komplett	"	"
$\frac{1}{256}$	0,0002	"	"	"	"
$\frac{1}{512}$	0,0001	"	"	"	"

Deuteroalbumose  $\gamma$  hemmte am wenigsten, während die primäre Albumose am stärksten hemmt. Man sieht also, daß das Eiweiß mit fortschreitender Spaltung nach und nach seine hemmende Wirkung einbüßt.

Wir haben nun weiterhin untersucht, inwieweit die dem Eiweiß eigentümliche hemmende Wirkung auch den weiteren Abbauprodukten zukommt. Zunächst untersuchten wir den Einfluß niederer Spaltprodukte wie Leucin, Tyrosin und Cystin.

Diese wurden in stark verdünnter Ammoniaklösung gelöst, mit dem Kaolin versetzt, das nachher mit physiologischer Kochsalzlösung bis zum Eintritt der neutralen Reaktion ausgewaschen wurde. Diese Substanzen waren ohne Einfluß auf die Kaolinhämolysen. Dagegen zeigt das Witte-Pepton einen ähnlich hemmenden Einfluß, wie er dem Eiweiß zukommt.

Daß es sich aber dabei nicht um eine Hemmung durch reines Pepton handelte, sondern durch die dem Witte-Pepton bekanntlich in größeren Mengen beigemischten Albumosen, ergaben weitere Versuche mit reinem Seidenpepton.

Tabelle IX.

Wirkung der Albumose resp. Peptone auf Kaolinhämolysen.

- A. Witte-Pepton 5 g in 50 ccm NaCl unter Kochen gelöst, filtriert.  
 B. Seidenpepton (Abderhalden) zu 10 Proz. in NaCl, löst sich klar.  
 C. Seidenpepton II (Abderhalden) zu 10 Proz. in NaCl.  
 Methodik wie üblich.

Verdünnung der Pepton- lösung	Menge des Peptons in g	Hämolysen mit		
		Pepton Witte	Seidenpepton (Abderh.)	Seidenpepton II (Abderhalden)
1	0,1	0	komplett	mäßig, kl. Kuppe
1/2	0,05	0	"	komplett
1/4	0,025	0	"	"
1/8	0,0125	0	"	"
1/16	0,00625	0	"	"
1/32	0,00313	Spur	"	"
1/64	0,00156	wenig, Kuppe	"	"
1/128	0,00078	mäßig, kl. Kuppe	"	"
1/256	0,00039	komplett	"	"
1/512	0,00019	"	"	"

Wir benutzten hier 2 Präparate, die uns in lebenswürdiger Weise früher durch Herrn Prof. Abderhalden zur Verfügung gestellt waren.

Das eine war leicht gelb, etwas weniger rein als das andere. Dieses zeigte noch eine geringe Hemmung der Hämolysen, während das reine Seidenpepton ohne Einfluß war.

Wir haben dann noch die Hemmungswirkung anderer kolloidaler Substanzen untersucht. Daß die Gelatine als ein Eiweißkörper die Kaolinhämolysen hemmt, ist nicht weiter verwunderlich.

Auffallender aber ist, daß reines Agar-Agar, in physiologischer Kochsalzlösung gelöst, sogar noch in beträchtlich ge-

ringeren Mengen wirkte als die Gelatine. Dies zeigt der folgende Versuch.

Tabelle X.

Hemmung der Kaolinhämolysen durch Gelatine und Agar.

Die Gelatine wird zu 10 Proz. in angewärmter physiologischer Kochsalzlösung gelöst, Agar-Agar in 0,5 Proz. Fallende Mengen beider Substanzen werden mit konstanter Menge (1 ccm 20-proz. Emulsion) Kaolin versetzt. Versuchsanordnung im übrigen wie vorher.

10-proz. Gelatine-lösung	Gelatine in g	Hämolyse	0,5-proz. Agar-Agar-lösung	Agar in g	Hämolyse
1,0	0,1	θ	1,0	0,005	θ
1/2	0,05	θ	1/2	0,0025	θ
1/4	0,025	θ	1/4	0,00125	θ
1/8	0,0125	θ	1/8	0,00063	θ
1/16	0,0063	Spur	1/16	0,00037	Spur
1/32	0,003	mäßig	1/32	0,00029	stark
1/64	0,0015	"	1/64	0,00015	"
1/128	0,0007	komplett	1/128	0,00007	komplett
1/256	0,00035	"	1/256	0,000035	"
1/512	0,0002	"	1/512	0,000018	"

Wir haben nun des weiteren darüber Versuche angestellt, ob die hämolysehemmende Wirkung des Serums durch Vorbehandlung mit Kaolin vermindert wird. Mit anderen Worten, ob das Kaolin dem Serum eine hemmende Substanz entzieht. Als Beispiel sei der folgende Versuch angeführt.

Tabelle XI.

5 ccm frisches Meerschweinchenserum werden mit 2,5 g Kaolin versetzt, 1 Stunde bei 37° gehalten, zentrifugiert. Der Abguß und eine Quote desselben, jedoch nicht mit Kaolin in Kontakt gewesenen Serums werden auf ihre hemmende Wirkung untersucht.

Verdünnung des Serums	Serummeng in ccm	Hämolyse bei	
		nativem Serum	mit Kaolin vorbehandelt. Serum
1/1	1,0	θ	θ
1/2	0,5	θ	θ
1/4	0,25	θ	Spur
1/8	0,125	θ	stark
1/16	0,06	θ	komplett
1/32	0,03	stark	"
1/64	0,015	komplett	"
1/128	0,0075	"	"
1/256	0,004	"	"
1/512	0,002	"	"

Es ergibt sich aus diesem Versuch, daß tatsächlich durch Vorbehandlung mit dem Kaolin die hemmende Kraft des Serums verringert wird.

Welcher Bestandteil des Serums ist nun für die Hemmungswirkung verantwortlich zu machen, das Eiweiß oder die ätherlöslichen Substanzen?

Wir haben zwar schon gesehen, daß das Cholestearin ohne Einfluß ist. Doch kann die Hämolyse immerhin durch andere Lipide bedingt sein. Zur Entscheidung dieser Frage dient der folgende Versuch.

Tabelle XII.

Einfluß der Aetherextraktion auf die hemmende Wirkung des Serums.

10 ccm Meerschweinchenserum wurden 10mal hintereinander mit je 40 ccm Aether im Scheidetrichter geschüttelt. Der Rückstand des gesammelten Aetherextraktes wird in 10 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen.

Mit diesem Aetherextrakt, dem extrahierten Serum und einer Quote frischen Serums desselben Tieres wird ein Hemmungsversuch angestellt, in dem fallende Mengen mit je 1 ccm 20-proz. Kaolinemulsion versetzt werden. Versuchsanordnung im übrigen wie oben.

Verdünnung des Serums	Serummenge	Hämolyse bei		
		nativem Serum	mit Aether vorbehandelt. Serum	Aether- extrakt
1/1	1,0	0	0	komplett
1/2	0,5	0	0	"
1/4	0,25	0	0	"
1/8	0,125	0	0	"
1/16	0,0625	0	0	"
1/32	0,0313	stark	stark	"
1/64	0,0156	komplett	komplett	"
1/128	0,0078	"	"	"
1/256	0,0039	"	"	"
1/512	0,0019	"	"	"

Aus diesen Versuchen ergibt sich also, daß der Aetherrückstand die Hämolyse nicht beeinflußt, während das mit Aether behandelte und das native Serum gleich wirksam sind.

Ein analoger Versuch wurde mit Eiereiweiß und Eidotter angestellt. Das Resultat zeigt die folgende Tabelle.

Tabelle XIII.

Je 5 ccm Eiweiß resp. Eidotter werden in der im vorigen Versuch für Serum angegebenen Weise mit Aether behandelt. Die Aetherextrakte



werden zur Entfernung der letzten Eiweißspuren noch durch Asbest filtriert.

Die Rückstände nach Verdunsten des Aethers werden in je 5 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen.

Prüfung der antihämolytischen Kraft des Aetherrückstandes und des mit Aether behandelten Eiweißes resp. Eigelbes, gegenüber Kaolin im Vergleich zu frischem Eiweiß und Eigelb. (Natürlich von derselben Mischung wie oben.)

Menge der hemmen- den Sub- stanz	Hämolyse bei					
	Eiereiweiß (nativ)	Eigelb (nativ)	Eiereiweiß (mit Aether behandelt)	Eigelb (mit Aether behandelt)	Aether- extrakt aus Eier- eiweiß	Aether- extrakt aus Eigelb
0,5	θ	θ	θ	θ	komplett	θ
0,2	θ	θ	θ	θ	"	komplett
0,1	θ	θ	θ	θ	"	"
0,05	θ	θ	θ	θ	"	"
0,01	θ	θ	θ	wenig, Kuppe	"	"
0,005	Spur	Spur	Spur	stark	"	"
0,001	stark, Hauch	stark, Hauch	stark, Hauch	komplett	"	"
0,0005	" "	" "	" "	"	"	"
0,0001	" "	" "	" "	"	"	"
0,00005	" komplett	" komplett	" komplett	"	"	"
0,00001	"	"	"	"	"	"
0,00	"	"	"	"	"	"

Aus diesem Versuch ergibt sich, daß das Eiweiß nach der Behandlung mit Aether ebenso stark hemmt wie das native Eiweiß, und andererseits das Aetherextrakt aus dem Eiweiß keinerlei hemmende Wirkung entfaltet.

Beim Eigelb bestehen gegenüber dem Eiweiß geringe Differenzen derart, daß das mit Aether behandelte Eigelb weniger stark antihämolytisch wirkt als das native. Auch das Aetherextrakt aus Eigelb entfaltet, allerdings in sehr starker Konzentration, eine minimale hämolysehemmende Kraft.

Wie noch weiter unten gezeigt wird, kommt auch dem reinen Lecithin eine gewisse antihämolytische Wirkung zu und wir möchten die Differenz bei dem Eigelb vor und nach der Aetherbehandlung im Vergleich zu Eiweiß und Serum auf den Lecithingehalt des letzteren bezw. auf seine Entfernung durch die Aetherextraktion zurückführen.

Als wichtigstes Resultat der vorstehenden Versuche sei noch einmal zusammenfassend festgestellt:

Eiweiß wirkt gegenüber der Kaolinhämolyse antihämolysierend. Durch Vorbehandlung mit Kaolin kann dem Eiweiß der hemmende Körper entzogen werden.

Die Extraktion mit Aether vermindert aber nicht die Kaolinhämolyse hemmende Wirkung.

Nicht nur das Serum, sondern auch die Blutkörperchen selbst enthalten Substanzen, welche antihämolysierend wirken. Benutzt man nämlich Kaolin, welches schon einmal zur Hämolyse gedient hat, nach dem Zentrifugieren, erneut auch gegenüber demselben Blut, so erscheint seine hämolysierende Kraft beträchtlich geschwächt.

Als Beispiel sei der folgende Versuch angeführt.

Tabelle XIV.

Hämolysisches Vermögen des Kaolins, welches einmal rote Blutkörperchen aufgelöst hat.

4 g Kaolin mit 8 ccm der 5-proz. Hammelblutkörperchen-Aufschwemmung versetzt, 1 Stunde im Brutschrank vollständig aufgelöst. Abzentrifugiert, der Bodensatz 2mal mit NaCl-Lösung gewaschen. Bodensatz in 20 ccm NaCl-Lösung emulgiert = A.

4 g frisches Kaolin in 20 ccm NaCl-Lösung emulgiert = B. Hämolyse mit diesen beiden Kaolinquoten in fallenden Mengen.

Menge des 20-proz. Kaolin	Kaolin in g	Hämolyse mit	
		A (m. Blutk. beh. K.)	B (nicht beh. K.)
2,0	0,4	stark	komplett
1,0	0,2	Spur	„
0,8	0,16	θ	„
0,6	0,12	θ	„
0,4	0,08	θ	„
0,2	0,04	θ	stark
0,1	0,02	θ	„
0,08	0,016	θ	mäßig
0,06	0,012	θ	wenig
0,04	0,008	θ	Spur
0,01	0,004	θ	θ

Es galt nun, weiter zu entscheiden, ob die antihämolysierende Substanz der Blutkörperchen im wesentlichen dem Stroma oder den wasserlöslichen Bestandteilen (Hämoglobin usw.) angehört.

Hierüber gibt der folgende Versuch Aufschluß.

Tabelle XV.

Die Blutkörperchen von 2 ccm Meerschweinchenvollbut werden nach sorgfältigem Waschen in 2 ccm destillierten Wassers gelöst, nach erfolgter Hämolyse zentrifugiert. Der Bodensatz der Blutkörperchenschatten wird in 4 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen. Der die wasserlöslichen Bestandteile enthaltende Abguß wird durch Zusatz von 0,017 Kochsalz auf Isotonie gebracht. Fallende Mengen der Stromataaufschwemmung und der Hämoglobinslösung werden mit je 1 ccm 20-proz. Kaolinemulsion versetzt. Weitere Versuchsanordnung wie gewöhnlich. Prüfung der abzentrifugierten Kaolinsedimente auf ihre hämolytische Fähigkeit.

Menge der hemmenden Substanz	Hämolyse bei Kaolin beh. mit	
	Hämoglobin	Stroma
1,0	θ	θ
$\frac{1}{2}$	θ	θ
$\frac{1}{4}$	θ	mäßig
$\frac{1}{8}$	θ	komplett
$\frac{1}{16}$	θ	"
$\frac{1}{32}$	Spur	"
$\frac{1}{64}$	"	"
$\frac{1}{128}$	mäßig	"
$\frac{1}{256}$	komplett	"
$\frac{1}{512}$	"	"

Aus diesen Versuchen ergibt sich, daß innerhalb der roten Blutkörperchen die antihämolytische Substanz im wesentlichen in den wasserlöslichen Bestandteilen (Hämoglobin) sich findet.

Es gelingt durch wiederholte Digestion von Kaolin mit Blutkörperchen leicht, diesem seine hämolytische Kraft völlig zu nehmen. Es erscheint nun zur Erklärung des Mechanismus der Kaolin-hämolyse wichtig, daß durch Hämoglobin bzw. Blutkörperchen seines hämolytischen Vermögens vollkommen beraubtes Kaolin aus einem Normalserum keine antihämolytische Substanz mehr adsorbiert.

Das zeigt der folgende Versuch.

Tabelle XVI.

1 g Kaolin wird mit 5 ccm 5-proz. Hammelblutkörperchen 1 Stunde bei 37° gelassen. Dann wird zentrifugiert und der Bodensatz so lange mit der gleichen Menge der gleichen Blutkörperchen wieder versetzt, bis auch jede Spur von Hämolyse ausbleibt.

Das ist nach 9maligem Zusatz der Blutkörperchen der Fall. Danach werden 3 ccm frisches Meerschweinchenserum mit dem zu behandelnden Kaolin 1 Stunde bei 37° in Kontakt gelassen. Dann wird zentrifugiert. Abguß = Serum A.

B. 3 ccm frischen Serums desselben Meerschweinchens werden mit 1 g frischen Kaolins versetzt. Behandlung im übrigen wie oben. Abguß = Serum B.

C. 3 ccm frisches Meerschweinchenserum vom selben Tier bleibt ohne Kaolin. 1 Stunde im Brutschrank. Abguß = Serum C.

Die antihämolytische Kraft der Serumquoten A, B und C wird in der üblichen Weise geprüft.

Das Resultat zeigt die nachstehende Tabelle.

Menge des Serums	A. Mit durch Blutkörp. gesättigtem Kaolin behandelt	B. Mit frischem Kaolin behandelt	C. Natives Serum
$\frac{1}{1}$	0	0	0
$\frac{1}{2}$	0	geringe Spur	0
$\frac{1}{4}$	0	wenig	0
$\frac{1}{8}$	0	stark	0
$\frac{1}{16}$	wenig	komplett	mäßig
$\frac{1}{32}$	stark	"	stark
$\frac{1}{64}$	komplett	"	komplett
$\frac{1}{128}$	"	"	"
$\frac{1}{256}$	"	"	"
$\frac{1}{512}$	"	"	"
0	"	"	"

Vergleichen wir das Resultat dieses Versuches mit den früheren Hemmungsversuchen mit Eiweiß, so ergibt sich im Zusammenhang die Tatsache, daß nicht nur die Adsorption von Eiweiß durch das Kaolin die Hämolyse hemmt, sondern daß auch die vorausgegangene Hämolyse dem Kaolin seine Fähigkeit nimmt, die hemmende Substanz aus dem Eiweiß zu adsorbieren. Wir können danach die Hämolyse durch das Kaolin als durch eine Adsorption von Eiweiß aus den Blutkörperchen bedingt auffassen.

Das Kaolin spielt dann in seinem Verhalten zum Serum einerseits und Blutkörperchen andererseits doch wieder eine ähnliche Rolle, wie das Saponin im Verhältnis zum Cholestearin, wenn auch freilich eben der Angriffspunkt der beiden Blutgifte ein ganz verschiedener ist. Bei der Saponinhämolyse beruht die schützende Wirkung des Serums nach den Untersuchungen von Ransom bekanntlich darauf, daß das Saponin sich mit dem Cholestearin des Serums verbindet und so von den Blutkörperchen ferngehalten wird. Bei der Kaolin-hämolyse können wir entsprechend dem Resultat der voraus-

gegangenen Versuche annehmen, daß bei Gegenwart von Serum das Kaolin-Eiweiß aus dem Serum adsorbiert und nicht aus den Blutkörperchen, die dadurch vor der Hämolyse geschützt sind.

Wir haben also hier bei der Kaolin-hämolyse eine Lösung durch eine chemisch völlig indifferente und dazu noch unlösliche Substanz.

Es sei noch bemerkt, daß der Hämolyse regelmäßig eine Agglutination der Blutkörperchen vorausgeht, die auch bei den Grenzmengen, bei denen keine komplette Hämolyse mehr erfolgt, noch nachweisbar ist.

Es wäre hier an die Versuche von Landsteiner zu erinnern, der bekanntlich vor Jahren die interessanten Beobachtungen mitgeteilt hat, daß die Kieselsäure gleichfalls imstande ist, Blutkörperchen zu agglutinieren. Eine Hämolyse durch die Kieselsäure findet jedoch nicht statt. Sie erfolgt erst bei Zusatz von Lecithin.

Wir haben also da einen abweichenden Mechanismus, d. h. ein komplexes Phänomen, ähnlich der spezifischen Hämolyse durch Ambozeptor und Komplement.

Eine weitere Abweichung besteht darin, daß im Gegensatz zur Kieselsäure das Lecithin auch auf die Kaolin-hämolyse keinen fördernden, sondern im Gegenteil einen deutlich hemmenden Einfluß hat. Das zeigen die beiden folgenden Versuche.

Tabelle XVII.

Hemmung der Kaolin-hämolyse durch Lecithin.

3-proz. Emulsion von Lecithin purum (Riedel). Kaolin in konstanten Mengen. Lecithin in fallenden Mengen. Versuchsanordnung wie üblich.

20-proz. Kaolin-emulsion	3-proz. Lecithin-emulsion	Lecithin in g	Hämolyse
1,0	1,0	0,03	θ
"	$\frac{1}{2}$	0,015	θ
"	$\frac{1}{4}$	0,0075	θ
"	$\frac{1}{8}$	0,0033	Spur
"	$\frac{1}{16}$	0,0016	wenig
"	$\frac{1}{32}$	0,0008	stark
"	$\frac{1}{64}$	0,0004	"
"	$\frac{1}{128}$	0,0002	komplett
"	$\frac{1}{256}$	0,0001	"
"	$\frac{1}{512}$	0,00005	"

Zeitschr. f. Immunitätsforschung. Orig. Bd. XIII.

10

Tabelle XVIII.

Hemmende Wirkung von Lecithin auf die Koalinhämolyse.

Lecithin purum (Riedel) in 0,3-proz. Emulsion in konstanten Mengen. Kaolin in fallenden Mengen. Versuchsanordnung wie üblich.

Menge der 20-proz. Kaolin- emulsion	Kaolin in g	0,3-proz. Lecithin- emulsion	Hämolyse	
			mit Lecithin	ohne Lecithin
1,0	0,2	1,0	komplett	komplett
0,8	0,16	"	"	"
0,6	0,12	"	fast komplett	"
0,4	0,08	"	Spur	"
0,2	0,04	"	ø	stark
0,1	0,02	"	ø	wenig
0,08	0,016	"	ø	"
0,06	0,012	"	ø	Spur
0,04	0,008	"	ø	ø
0,02	0,004	"	ø	ø

Wir haben dann noch eine Reihe weiterer Suspensionskolloide auf ihre hämolytische Wirkung geprüft, vor allem das Aluminiumhydroxyd und Talcum (Magnesiumsilicat).

Ihre Wirkung ist bedeutend geringer als die des Kaolins. Auch hier findet eine Hemmung durch Eiweiß statt. Das zeigen die beiden folgenden Tabellen.

Tabelle XIX.

Hämolytische Wirkung von Aluminiumhydroxyd und Talcum.

1 ccm der 5-proz. Hammelblutkörperchenaufschwemmung mit je 1 ccm der Emulsion dieser Substanzen versetzt, 2 Stunden im Brutschrank, dann Ablesen des Resultates.

Menge der 20-proz. Emulsion	NaCl	Hämolyse des	
		Al-Hydroxyd	Talcum
1,0	0,0	komplett	komplett
0,8	0,2	"	fast komplett
0,6	0,4	"	wenig
0,4	0,6	fast komplett	Spur
0,2	0,8	"	"
0,1	0,9	stark	"
0,08	0,92	"	ganz, Spur
0,06	0,94	wenig	ø
0,04	0,96	Spur	ø
0,02	0,98	"	ø
0,01	0,99	ø	ø

Tabelle XX.

Hemmung der Hämolyse von Aluminiumhydroxyd  
und Talcum durch Eiweiß.

Fallende Mengen von Eiereiweiß. Konstante Mengen von hämolytischer  
Substanz: 1 ccm der 20-proz. Emulsion. Methode wie üblich.

Menge des Eiereiweiß	20-proz. Kaolin	Hämolyse bei	
		Al-Hydroxyd	Talcum
0,5	1,0	θ	θ
0,25	"	θ	θ
0,1	"	θ	θ
0,05	"	θ	θ
0,025	"	θ	θ
0,01	"	Spur	θ
0,005	"	wenig	θ
0,0025	"	"	Spur
0,001	"	mäßig	mäßig
0,0005	"	"	stark
0,00025	"	stark	"
0,0001	"	"	"
0,00005	"	komplett	komplett
0,000025	"	"	"
0,00001	"	"	"

In einer früheren Arbeit (Friedberger und Salecker)  
ist gezeigt worden, daß das Kaolin aus unverdünntem Serum  
keine Antikörper adsorbiert.

Es schien uns nun praktisch wichtig, darüber Versuche  
anzustellen, ob unter diesen Bedingungen der anaphylakto-  
gene Anteil des Eiweißes mehr oder weniger von dem Kaolin  
gebunden würde. Das wäre natürlich von großer praktischer  
Bedeutung gewesen, indem man auf diese Weise bei völliger  
Erhaltung der Antikörper weniger giftige Sera für die Heil-  
serumtherapie hätte herstellen können.

Leider bestätigte der Versuch diese Erwartung nicht, wie  
das die folgende Tabelle zeigt.

Tabelle XXI.

a) 12 ccm Hammelserum werden mit 2 g Kaolin 2 Stunden lang im  
Brutschrank bei 37° gehalten. Dann zentrifugieren. Abguß A.

b) 5 ccm desselben Serums werden 2mal in gleicher Weise behandelt.  
Abguß B.

c) 5 ccm Hammelserum bleiben zur Kontrolle entsprechend lang im  
Brutschrank stehen. Das Serum = C.

10\*

Es wird nun bei einer Reihe 24 Tage zuvor mit 0,02 Hammelserum vorbehandelter Meerschweinchen die tödliche Dosis der einzelnen Hammelserumquoten ausgewertet.

Tier No.	Körpergewicht	Dosis der Reinjekt. pro 200 g	Multipla	Ausgang
Natives Serum (C)				
K 13	210	0,0025	.	lebt
K 8	270	0,005	.	†
K 7	310	<b>0,01</b>	1	†
K 12	290	0,01	1	†
K 3	210	0,01	1	†
1mal mit Kaolin behandeltes Serum (A)				
K 10	270	0,05	5	†
K 18	250	0,025	2,5	†
K 25	280	<b>0,01</b>	1	†
K 21	261	0,01	1	†
2mal mit Kaolin behandeltes Serum (B)				
K 16	250	0,005	.	lebt
K 1	230	<b>0,01</b>	1	†
K 19	260	0,01	1	†

Ganz anders sind die Resultate bei Verwendung verdünnten Serums.

Tabelle XXII.

Hammelserum verdünnt 1:10.

10 ccm des verdünnten Serums mit 2 g Kaolin versetzt, 1 Stunde im Brutschrank.

10 ccm des verdünnten Serums ohne Kaolin im Brutschrank 1 Stunde.

Meerschweinchen präpariert mit je 0,02 Hammelserum am 2. Dez. 1911.

Reinjektion nach 16 Tagen.

Tier No.	Körpergewicht	Dosis der Reinjekt. pro 200 g	Multipla	Ausgang
B. Natives Serum				
L 153	190	0,01	.	†
L 167	220	0,01	.	lebt
L 145	250	0,01	.	†
L 138	240	<b>0,025</b>	.	†
L 166	190	0,025	.	†
L 158	220	0,025	.	†
A. Mit Kaolin behandeltes Serum				
L 146	240	0,025	1,0	lebt
L 161	220	0,038	1,5	†
L 140	200	<b>0,038</b>	1,5	†
L 148	220	0,05	2,0	†



Tabelle XXIII.

30 ccm des 1:10 verdünnten Hammelserums mit 15 g Kaolin versetzt, 1 Stunde im Brutschrank, dann zentrifugiert.

10 ccm vom Abguß mit 5 g Kaolin versetzt, 1 Stunde im Brutschrank, abzentrifugiert. Abguß = A.

30 ccm des 1:10 verdünnten Hammelserums, im Brutschrank 2 Stunden = B.

Reinjektion mit A und B bei 18 Tage zuvor präparierten Meer-schweinchen.

Tier No.	Körper-gewicht	Dosis der Reinjekt. pro 200 g	Multipla	Ausgang
B. Natives Serum				
L 163	340	0,005	.	lebt
L 149	300	0,0075	.	"
L 157	250	0,0075	.	"
L 162	250	0,015	1,0	†
L 142	300	0,015	1,0	†
L 150	260	0,015	1,0	†
A. Mit Kaolin behandeltes Serum				
L 151	260	0,015	1,0	lebt
L 154	250	0,023	1,0	"
L 147	230	0,03	2,0	"
L 152	240	0,075	5,0	"
L 137	230	0,15	10,0	†
L 141	230	0,23	15,0	†

Aus diesem Versuch ergibt sich also, daß das Kaolin nicht imstande ist, aus dem unverdünnten Serum die Anaphylaxie auslösenden Bestandteile in nachweisbaren Mengen zu adsorbieren. Im Gegensatz dazu sind dieselben aus dem verdünnten Serum durch das Kaolin absorbierbar. Dort wurden aber bekanntlich auch die Antikörper entsprechend adsorbiert.

Es war a priori zu erwarten, daß die toxische Wirkung, die das Kaolin und andere anorganische Suspensionskolloide, wie wir gesehen haben, gegenüber den Blutkörperchen entfalten, sich auch gegenüber anderen Zellen geltend machen wird. Vor allem interessierte es uns natürlich, ob sich nicht ein Einfluß auf Bakterien nachweisen ließe.

Eine ähnlich intensive und prompte Wirkung wie auf die empfindlichen Blutkörperchen war hier a priori ja nicht zu erwarten. Doch ist immerhin eine deutliche abtötende Wirkung, wie gleich vorweg bemerkt sein soll, nachzuweisen.

Ueber die desinfizierende Wirkung durch Kaolin und andere anorganische Kolloide soll demnächst in einer ausführlichen Arbeit Näheres berichtet werden.

Hier sei nur eine Versuchsreihe als Beispiel aufgeführt.

Tabelle XXIV.

Je 1,6 g Kaolin (Kahlbaum) wurde in 2 Reagenzröhrchen trocken sterilisiert.

Das eine Röhrchen wurde mit 5 ccm 1:5 verdünnten frischen Eiweißes, das steril entnommen ist, versetzt, 1 Stunde im Brutschrank, abzentrifugiert.

Fallende Mengen beider Kaolinquoten; jedes Röhrchen enthält 1 ccm steriler physiologischer NaCl-Lösung.

5 Oesen von frischer, gut gewachsener *Prodigiosus*kultur wurden in 50 ccm NaCl-Lösung aufgeschwemmt mit je 0,05, davon wurde jedes Röhrchen beimpft.

Nachdem die Kaolinemulsion durch Schütteln gleichmäßig emulgiert ist, wurden von jedem Röhrchen Platten gegossen und das gleiche weiterhin zu den in der Tabelle angegebenen Zeiten. Plattenzählung nach 48-stündiger Bebrütung.

Menge des Kaolins in g	Sofort	Nach 14 Std.	Nach 24 Std.	Nach 48 Std.
Natives Kaolin				
0,8	∞	0	0	0
0,4	∞	0	0	0
0,2	∞	0	0	0
0,1	∞	2	0	0
0,05	∞	2176	1536	1280
0,025	∞	4272	3266	2940
0,0125	∞	∞	∞	∞
0,0	∞	∞	∞	∞
Mit Eiweiß behandeltes Kaolin				
0,8	∞	∞	∞	∞
0,4	∞	∞	∞	∞
0,2	∞	∞	∞	∞
0,1	∞	∞	∞	∞
0,05	∞	∞	∞	∞
0,025	∞	∞	∞	∞
0,0125	∞	∞	∞	∞
0,0	∞	∞	∞	∞

### Zusammenfassung.

Die Arbeit enthält die Untersuchung über die hämolytische und bakterizide Wirkung des Kaolins und anderer Suspensionskolloide.

1) Eine Suspension von Kaolin löst verschiedene Blutkörperchen auf (untersucht wurden Mensch, Pferd, Rind, Hammel, Schwein, Hund, Meerschweinchen, Taube und Frosch).

2) Diese Hämolyse wird durch Serum gehemmt.

3) Der Mechanismus der Hämolyse entspricht nicht der Saponinhämolyse; denn das Cholestearin übt keine hemmende Wirkung aus.

4) Die hemmende Kraft des Serums wird durch 56° C nicht zerstört.

5) Die hemmende Kraft der verschiedenen Sera ist verschieden stark; am wenigsten hemmt unter den von uns untersuchten Serumarten das des Hammels, am stärksten das des Rindes und des Pferdes.

6) Die hemmende Wirkung des Serumglobulins ist etwas größer als die des Serumalbumins.

7) Eiweiß und Eidotter wirken gleichstark hemmend.

8) Von den Eiweißabbauprodukten wirkt die primäre Albumose am stärksten, die Deuteroalbumose  $\gamma$  nur wenig. Niedere Eiweißabbauprodukte, vom reinen Pepton beginnend, wirken nicht mehr hemmend. Das Eiweiß verliert also durch die Spaltung die hemmende Wirkung mehr und mehr.

9) Gelatine und Agar-Agar hemmen gleichfalls die Kaolin-hämolyse.

10) Kaolin ist imstande, dem Serum die hemmende Kraft zu entziehen.

11) Die hemmende Wirkung des Serums beruht nicht auf einer ätherlöslichen Substanz, sondern auf dem Eiweiß.

12) Auch Blutkörperchen enthalten antihämolytische Substanzen, die sich wesentlich im Hämoglobin befinden.

13) Da nicht nur durch Absorption des Eiweißes die Kaolin-hämolyse gehemmt wird, sondern auch die vorausgegangene Hämolyse dem Kaolin die blutlösende Fähigkeit entzieht, so können wir die Hämolyse als durch Absorption des Eiweißes durch Kaolin bedingt auffassen.

14) Die Hämolyse durch Kaolin wird im Gegensatz zu der Hämolyse durch die Kieselsäure durch Lecithin nicht komplettiert, sondern gehemmt.

15) Aluminiumhydroxyd und Talcum verhalten sich in ihrer Wirkung wie Kaolin.

16) Bei der Behandlung des konzentrierten Serums mit Kaolin bleibt die Toxizität gegen die präparierten Meer-schweinchen erhalten, bei der Behandlung des verdünnten Serums nimmt sie ab.

17) Auch auf Bakterien hat das Kaolin eine abtötende Wirkung.

*Nachdruck verboten.*

[Aus der Bakteriologischen Abteilung des Rudolf-Virchow-Kranken-hauses zu Berlin (Leiter: Priv.-Doz. Dr. Liefmann).]

### **Ueber die Hypothese der lipoiden Natur des Komplementes.**

Von Priv.-Doz. Dr. Liefmann, M. Cohn und Dr. Orloff.

(Eingegangen bei der Redaktion am 29. Januar 1912.)

Seit einigen Jahren wird vielfach über die Vermutung diskutiert, daß die Serumsstanzen, an die die Komplement-funktion gebunden ist, lipoider Natur seien. Die Begründer dieser Anschauung sind H. Noguchi<sup>1)</sup> und L. v. Liebermann<sup>2)</sup>. Eine große Anzahl von Autoren hat die interessante Hypothese dieser zwei Autoren näher geprüft, sie sind aber fast alle zu einem negativen Resultat gekommen [v. Dungern und Coca<sup>3)</sup>, H. Sachs und Altmann<sup>4)</sup>, Hecker<sup>5)</sup>, Friedemann und Fritz Sachs<sup>6)</sup>, v. Knaffl-Lenz<sup>7)</sup>, Liefmann und Cohn<sup>8)</sup>].

In jüngster Zeit hat v. Liebermann in Gemeinschaft mit v. Fenyvessy<sup>9)</sup> seine Hypothese durch neue Ver-

1) Noguchi, Biochem. Zeitschr., Bd. 6, 1907.

2) v. Liebermann, Arch. f. Hyg., Bd. 62, 1907.

3) v. Dungern und Coca, Berl. klin. Wochenschr., 1907, No. 46.

4) H. Sachs und Altmann, Berl. klin. Wochenschr., 1908, No. 10.

5) Hecker, Arb. a. d. Inst. f. exp. Therapie, 1907, Heft 3.

6) Friedemann und Fritz Sachs, Biochem. Zeitschr., Bd. 12, 1908.

7) v. Knaffl-Lenz, Biochem. Zeitschr., 1909.

8) Liefmann und Cohn, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 6, 1910.

9) v. Liebermann und v. Fenyvessy, Zeitschr. f. Immunitätsf., 1911.

suche zu stützen gesucht, indem er sich nachzuweisen bemühte, daß

- 1) gewisse Seifen-Eiweißmischungen besonders stark auf ambozeptorbeladene Blutkörperchen wirken, und daß sie
- 2) nach denselben Methoden wie das Komplement in 2 Teile zerlegbar seien.

Es ist keine Frage, daß der Liebermannschen Hypothese — wenn sie sich bestätigte — eine große Bedeutung zukäme. Das Komplement ist ein so wichtiger, und bei so vielen Immunitätsreaktionen beteiligter Körper, daß, wenn es gelänge, ihn künstlich herzustellen, und z. B. den Komplementgehalt des Serums zu erhöhen, eine günstige Wirkung bei vielen infektiösen Prozessen wohl erwartet werden könnte.

Wir haben uns daher von neuem bemüht, die Liebermannschen Beobachtungen einer Prüfung zu unterwerfen.

Die Seife, deren wir uns bei unseren Versuchen bedienten, war zum geringeren Teile Natr. oleinic. von Merck, in den meisten Fällen aber die von Kahlbaum. Das erste Präparat fällt in Kochsalzlösung im allgemeinen sehr rasch aus, es handelt sich dabei offenbar um das sogenannte Auskernen, das bei der Kahlbaumschen Substanz erst viel später sich bemerkbar macht. Aber auch diese trübt sich bei mehrstündigem Stehen, und damit Hand in Hand geht eine allmähliche Abnahme der hämolytischen Kraft. Die Trübung erfolgt nicht oder viel langsamer, wenn man als Lösungsmittel Aqu. dest. benutzt. Es ist deshalb zweckmäßig, für jeden Versuch sich eine Stammlösung in Aqu. dest. zu machen, und erst die endgültigen Verdünnungen mit Kochsalzlösung herzustellen. Die Blutkörperchen, die wir benutzten, entstammten dem Hammel, das Ambozeptorserum teils Kaninchen, teils einer Ziege.

## I.

### **Das Verhalten der sensibilisierten Blutkörperchen gegenüber Seifelösungen.**

Den Kern der Darlegungen von Liebermann und v. Fenyvessy bildet — wie die Verfasser wiederholt hervor-

heben — die Beobachtung, daß sensibilisierte Blutzellen durch die Seife schneller und durch geringere Mengen aufgelöst werden als nicht sensibilisierte. Wir haben hinsichtlich dieser Erscheinung in unseren früheren Versuchen kein bestätigendes Ergebnis erzielt. Auch unter den übrigen Untersuchern herrscht keine Uebereinstimmung. v. Liebermann und v. Fenyvessy fordern nun für die Abgabe eines einwandfreien Urteils die Ausschaltung jeglicher Agglutination der roten Blutkörperchen und die Entfernung des überschüssigen Immunserums, weil beides die Seifenhämolyse hemmt. Die Agglutination läßt sich nun zweifellos in gewissem Grade vermeiden, durch Auswahl besonders günstiger Seren. Auch wir haben mit solchen Seren gearbeitet, die scheinbar keinerlei Agglutination der Blutzellen hervorrufen. Jedoch glauben wir nach unseren Erfahrungen, daß es schlechterdings überhaupt kein hämolytisches Immunserum gibt, das nicht eine gewisse Verklumpung und Zusammenballung der Blutzellen (beim Zentrifugieren) bewirkt.

Jedenfalls haben wir noch kein hämolytisches Immunserum beobachtet, das nicht die sensibilisierten Blutzellen so verändert hätte, daß beim Zentrifugieren der Bodensatz zäher und schwerer aufzuschütteln gewesen wäre als der nicht sensibilisierter. Es liegt nun von vornherein sehr nahe, zu vermuten, daß bei öfterem Zentrifugieren und Wiederaufwirbeln solcher sensibilisierter Blutkörperchen eine Schädigung derselben resultiert, und wir werden sehen, daß dieser Vermutung eine große Bedeutung für die Erklärung der v. Liebermannschen Versuche zukommt.

Die Autoren behaupten nämlich, daß die Wirkung des Ambozeptors darin bestände, daß er die Resistenz der Blutkörperchen gegenüber der Seifenhämolyse (aber auch der anderer hämolysierender Stoffe) herabsetze. Diese Behauptung stützen sie auf Versuche, in denen sie die sensibilisierten Blutzellen öfters (3—4mal) zentrifugiert und wieder aufgewirbelt haben. Zwar blieb es ihnen nicht verborgen, daß das öftere Auswaschen auf der Zentrifuge die sensibilisierten Blutzellen schädigt. Sie haben diesem Umstand aber nicht genügende Beachtung geschenkt, und sich nicht gefragt, welchen Anteil diese Schädigung an der schnelleren Auflösung dieser

Blutkörperchen hat. Sie haben in ihren Versuchen die Seifenhämolyse sensibilisierter und 3mal gewaschener Blutzellen verglichen mit der mit Normalserum beschickter (und im übrigen gleich behandelter) Blutkörperchen. So glaubten sie den Einfluß der Serum-Ambozeptorwirkung klar erkennen zu können.

Das aber ist, wie wir in eindeutiger Weise zeigen können, ein Irrtum. Es ist nämlich weder das Sensibilisieren noch das Zentrifugieren der Blutzellen allein, was ihre Schädigung bedingt, sondern erst die Kombination der beiden Maßnahmen ist es, die diese Wirkung hervorruft. Die Liebermannsche Kontrolle mit Normalserum ist in Wirklichkeit keine Kontrolle, weil sie die Hauptfehlerquelle nicht ausschaltet.

Um unsere Ansicht noch klarer auszusprechen, wollen wir sie so formulieren:

Liebermann und v. Fenyvessy behaupten, daß die Wirkung des Ambozeptors in einer Schädigung der Blutzellen besteht, die diese gegenüber verschiedenen chemischen Einflüssen weniger resistent mache. Die Versuche der Autoren lassen aber einen solchen Schluß nicht zu. Die Resistenzverminderung, die die Autoren beobachten, ist jedenfalls zu einem erheblichen Teil auf die Schädigung zurückzuführen, die gerade die mit Immunserum beladenen Blutzellen, nicht aber unbeladene oder mit Normalserum behandelte durch öfteres Waschen erleiden.

Daß dem so ist, läßt sich leicht durch eine Versuchsanordnung zeigen, bei der sensibilisierte Blutzellen mehrmaliger Zentrifugierung (und Aufwirbelung) unterworfen werden — aber ohne daß die überstehende Flüssigkeit abgegossen wird. Lösen sich die Blutkörperchen nach dieser Prozedur deutlich rascher auf, als vor derselben, während nicht sensibilisierte Blutzellen beim Zentrifugieren ihre Resistenz nicht wesentlich ändern, so kann man mit Sicherheit behaupten, daß die ausgeführten Prozeduren einen wesentlichen Anteil an der schnellen Auflösung gerade der sensibilisierten Zellen haben, und es wird durchaus fraglich, ob der Ambozeptor, wie dies v. Liebermann und v. Fenyvessy annehmen, an und für sich eine Schädigung bewirkt.

Wir wollen in Kürze einen derartigen Versuch beschreiben.

5-proz. Hammelblutkörperchen, Ambozeptor vom Kaninchen, Titer 1:2000, davon 10 Einheiten verwendet.

Blutkörperchen + Ambozeptor  $\frac{1}{200}$  25 Minuten bei Zimmertemperatur gehalten = Blutkörperchen präpariert.

Dasselbe 4mal zentrifugiert und jedesmal ohne abzugießen aufgewirbelt = Blutkörperchen präpariert und zentrifugiert.

Versuch im Wasserbad bei 37°.

No.	Seife $\frac{1}{1000}$	NaCl	
1	0,2	1,8	Blk. nicht sensib. 1,0 n. 21' total gelöst
2	0,2	0,8	Blk. präpariert 2,0 n. 30' ungelöst, kommt sehr langsam zur Lösung
3	0,2	0,8	Blk. präp. u. zentr. 2,0 n. 12' total

Röhrchen 2 und 3 unterscheiden sich also nur dadurch voneinander, daß in 2 die Blutkörperchen einfach sensibilisiert waren, während in 3 die Blutkörperchen dann noch 4mal zentrifugiert und wieder aufgewirbelt wurden, aber ohne daß dabei die überstehende Flüssigkeit abgegossen wurde. Daß nicht sensibilisierte Blutkörperchen beim Zentrifugieren und Wiederaufwirbeln nicht wesentlich geschädigt werden, brauchen wir nicht durch ein besonderes Protokoll zu belegen. Aber ebenso wie diese verhalten sich mit Normal-Kaninchenserum behandelte Blutzellen. Daraus folgt einwandfrei, daß die Sensibilisierung zusammen mit dem Zentrifugieren und Waschen eine Schädigung bedingt, aber dafür, daß der Ambozeptor an und für sich einen solchen Effekt ausübt, fehlt jeder Beweis.

Es ist nun recht interessant, daß durchaus nicht alle Ambozeptoren, die wir prüften, gleichmäßig auf die Blutkörperchen einwirkten; bei dem einen war beim Waschen eine große Schädigung der Blutkörperchen zu bemerken, bei den anderen nur eine geringe. Wir haben den Eindruck, daß die Seren, die in großer Verdünnung verwendet werden konnten, beim Waschen wenig Schädigung hinterließen, obwohl von ihnen die gleiche Zahl (10) an Ambozeptoreinheiten verwendet wurde. Und es ist recht bezeichnend, daß wir mit diesen sehr hochwertigen Seren auch die Liebermannschen Versuche nicht wiederholen konnten, weder Seife allein noch Kombination mit Serum und mit Alkali ließen eine deutlich schnellere Auflösung der so sensibilisierten Blutkörper erkennen. Dr. Orloff hat sich die größte Mühe gegeben, die



Versuche von v. Liebermann und v. Fenyvessy, die mit Rinderblut ausgeführt worden waren, mit Hammelblut und dem hochwertigen Ziegenimmunserum, das wir besaßen (Titer 0,00005), zu wiederholen. Auch Alkalizusatz zu den Seifen-eiweißgemischen in den verschiedensten Mengen hatte keinen erkennbaren Einfluß. Daß v. Liebermann zu seinem Resultate kam, ist sehr begreiflich; einmal deswegen, weil er mit Blutkörperchen arbeitete, die durch Sensibilisierung + Waschung stark gelitten hatten, und zweitens, weil nach Rondoni<sup>1)</sup> gerade die Rinderblutkörperchen (besonders wohl die vorher leicht geschädigten) gegen Alkali empfindlich sind.

## II.

Wie erwähnt ist, das zweite Argument, daß v. Liebermann und v. Fenyvessy für die Seifennatur der Komplemente ins Feld führen, das der Spaltbarkeit. Sie führen Versuche an, in denen es ihnen gelang, eine Seifeneiweißlösung durch Kohlensäurespaltung in zwei unwirksame Teile zu zerlegen, die aber zusammengefügt wieder Hämolyse gaben.

Es ist gewiß, daß, wenn Seifeneiweißlösungen das gleiche eigenartige Verhalten aufweisen würden, wie es dem Komplement in dieser Hinsicht zukommt, das in zwei völlig unwirksame Elemente, die sich in vielfacher Beziehung recht verschieden verhalten, zerlegen läßt, diese Tatsache ein wichtiges Argument für die Lipoidnatur des Komplementes wäre. Es läßt sich nun aber leicht zeigen, daß die Spaltung des Liebermannschen Seife-Eiweißgemisches mit der Komplementspaltung nur eine entfernte äußere Ähnlichkeit hat, im übrigen aber ganz anderen Gesetzen folgt als diese und eine andere Grundlage hat.

Wir haben Gemische von Hammelserum wie auch von Menschenserum mit Seife nach der von Sachs und Altmann<sup>2)</sup> angegebenen Methode (mit HCl) gespalten. Globulin- und Albuminteil kamen in 10-facher Verdünnung zur Anwendung. Die Mischung bestand in einem Falle aus 1,5 Serum von Hammel + 1,5 Seife  $\frac{1}{100}$  (20 Minuten bei 37° digeriert), im anderen aus 3,0 Serum vom Menschen + 1,0 Seife  $\frac{1}{100}$ . Das Ergebnis im letzteren Falle war folgendes:

1) Rondoni, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 7, 1910.

2) Siehe Handbuch der Technik und Methodik der Immunitätsf., Bd. 2, p. 969.

Lösung von 0,5 5-proz. Hammelblutes (Resultat nach 2 Stunden bei 37°, dann 20 Stunden auf Eis abgelesen).

a) Globulinteil	3,0	in	3,5	Gesamtflüssigkeit	total
"	2,5	"	3,0	"	"
"	2,0	"	2,5	"	"
"	1,5	"	2,5	"	"
"	1,0	"	2,5	"	Spur
"	0,5	"	2,5	"	ungelöst
b) Albuminteil	3,0	"	3,5	"	total
"	2,5	"	3,0	"	"
"	2,0	"	2,5	"	fast total
"	1,5	"	2,5	"	"
"	1,0	"	2,5	"	Spur
"	0,5	"	2,5	"	ungelöst

Die Auflösung der Blutkörperchen bei Verwendung größerer Dosen ging mäßig schnell von statten, die kleineren Dosen (1,5) lösten ganz langsam, selbst nach 2 Stunden war nur geringe Lösung zu bemerken.

Wie wirken nun die beiden Teile bei der Zusammenfügung?

Nr.	Hammelblut- körperchen	NaCl	Globu- linteil	5' Pause	Albumin- teil	Nach 2 <sup>h</sup> 37°, dann 20 <sup>h</sup> Eis
1	0,5	ad 2,5	0,25	bei 37°	0,25	ungelöst
2	0,5	" 2,5	0,5	" 37°	0,5	Spur
3	0,5	" 2,5	0,5	" 37°	1,5	"
4	0,5	" 2,5	0,5	" 37°	2,5	stark gelöst
5	0,5	" 2,5	1,0	" 37°	1,0	sofort stark gelöst, nach 24 <sup>h</sup> aber nicht mehr
6	0,5	" 5,0	2,0	" 37°	2,0	sofort total
7	0,5	—	3,0	—	3,0	" "

Man könnte, wenn man das Resultat nach 24 Stunden betrachtet, zunächst meinen, die Spaltung habe nur das Resultat gehabt, daß die Seife einfach in zwei Teile zerlegt gewesen, und daß der stärkere Effekt der Vereinigung beider nur auf eine Addition zurückzuführen sei. Diese Anschauung ist aber zweifellos nicht richtig. Das ergab sich aus der Betrachtung der Röhrchen 6 und 7. 2,0 des Globulinteiles löste ganz langsam, 2,0 des Albumins auch nach 24 Stunden nicht total, und doch war bei der Zusammenfügung der zwei Teile eine sofortige totale Hämolyse zu beobachten. Auch die Dosis von 1,0 beider Teile führte zu einer sofortigen starken Lösung (die aber auch nach 24 Stunden nicht weiter fortgeschritten war). Es kann keinem Zweifel unterliegen, daß

bei diesem Versuche eine „Beschleunigung“ der Lösung eingetreten war, und so könnte man vermuten, daß es sich um eine der Komplementspaltung analoge Erscheinung handele. Aber jeder, der mit den Arbeiten über die Hämolyse durch Lipoide vertraut ist, wird sofort einsehen, daß diese „Beschleunigung“ eine ganz bekannte Erscheinung ist, die man mit Seife und mit Oelsäure sehr leicht, aber nicht mit Komplement erzielen kann. Es handelt sich um ein Phänomen, das von einer größeren Anzahl von Autoren genauer untersucht worden ist<sup>1) 2) 3) 4)</sup>, und das darin besteht, daß sehr geringfügige Seifen- oder Oelsäuremengen Blutkörperchen so verändern, daß sie durch nachträglichen Zusatz von Natronlauge oder von Serum (frischem oder erhitztem), oder von Albumin (nicht von Globulin) ungemein schnell aufgelöst werden. In unserem Versuche sind alle Faktoren für das Eintreten dieses von uns als „Beschleunigungsphänomen“ bezeichneten Vorganges gegeben, und es ist daher von vornherein anzunehmen, daß es hier eine Rolle spielt. Es ist recht charakteristisch für diese Reaktion, daß sie nur dann eintritt, wenn eine Seifen- oder Oelsäuremenge verwendet wird, die auch allein (wenn auch ganz langsam) zur Lösung führt. Auch in unserem Versuche sehen wir dasselbe.

Erst mit 2,0 Globulinteil, d. h. der auch allein (aber ganz langsam) lösenden Dosis tritt völlige Hämolyse ein, während eine kleinere Dose (1,0) zwar auch sofortige, aber nicht totale Lösung erzielt. (Das ist beim Komplement und seinen zwei Teilen gänzlich anders, da sie in kleiner Dosis langsam, aber total lösen.) Um noch sicherer zu zeigen, daß es sich bei dieser sogenannten Spaltung nur um das „Beschleunigungsphänomen“ handelte, haben wir an Stelle des Albuminteiles ein Albumin eines nicht mit Seife behandelten (inaktiven) Serums gesetzt. Dieses Albumin gab genau den gleichen Effekt wie das des Seife-Serumgemisches. Man wird sich vielleicht darüber wundern, daß von der dem Serum zugesetzten Seife ein anscheinend erheblicher Teil in den

- 1) v. Dungern und Coca, l. c.
- 2) Friedemann und F. Sachs, l. c.
- 3) F. Sachs, Biochem. Zeitschr., Bd. 12, 1908.
- 4) Liefmann und Cohn, Biochem. Zeitschr., Bd. 26, 1910.

Bodensatz übergegangen ist. Das stimmt aber mit unseren früheren Erfahrungen aufs beste überein. Das ausfallende Globulin (Euglobulin) reißt eine Menge von Seife (resp. Oelsäure) mit sich nieder<sup>1)</sup>.

### III.

Mußten wir bei der Nachprüfung dieser Argumente der Liebermannschen Arbeit zu dem Schlusse kommen, daß sie eine ganz andere Deutung, als die Autoren ihnen zuschreiben, zu erfahren haben, so suchten wir auch weiterhin zu prüfen, wie die Seifenhypothese mit anderen Tatsachen der Komplementwirkung sich vereinigen läßt.

Es ist bekannt, daß das Komplement keinerlei Affinität zu nicht sensibilisierten Blutzellen hat (Ehrlich), man mußte sich daher die Frage vorlegen, ob die Liebermannschen Seife-Serummischungen diese Eigenschaft mit dem Komplemente teilen. Zur Verwendung kam eine Mischung von 5,0 Hammelserum ( $\frac{1}{50}$ ) + 5,0 Seife ( $\frac{1}{5000}$ ) (10 Minuten bei 37° digeriert). Diese Mischung (1,0 ccm) löste 4mal gewaschene sensibilisierte Blutkörperchen (infolge der Schädigung beim Waschen) schon nach 6 Minuten (bei 37°), während 4mal gewaschene nicht sensibilisierte sich erst nach 13 Minuten lösten.

Nun wurden in mehreren Röhrchen je 0,5 Blutkörperchen + 1,0 Serumseife 5 Minuten bei Leitungswassertemperatur (15°) gehalten, dann zentrifugiert und Sediment und Abguß getrennt; dies gelingt vollständig, der Abguß ist nicht hämolytisch.

Das Sediment, in Kochsalzlösung aufgeschwemmt, löst sich bei 37° etwa in 3 Minuten auf. Der Abguß hingegen löst 1,0 Blutkörperchen, präpariert und zentrifugiert, auch nach 1 Stunde nicht spurweise auf.

Hieraus geht hervor, daß unsensibilisierte Blutkörperchen einem hämolytischen Seifen-Serumgemenge die hämolytische Substanz entzogen haben, so daß jetzt nicht einmal mehr die durch Waschen geschädigten sensibilisierten Erythrocyten von dem Abguß aufgelöst werden konnten.

1) Siehe Liefmann und Cohn, l. c., und Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 6, 1910, p. 88.

#### IV.

Die neuere Forschung hat nun eine Anzahl interessanter Eigenschaften, die dem Komplement zukommen, näher erforscht, und es ist nicht ohne Interesse, festzustellen, wie weit diese sich bei Seife-Eiweißmischungen wieder vorfinden.

Bezüglich einiger Fragen sind schon derartige Vergleiche zwischen Komplement und Seife angestellt worden.

a) Man weiß, daß die Komplementwirkung in hohem Grade von der Konzentration des Komplementes abhängig ist<sup>1) 2)</sup>. Bei der Seife ist, wie man fand<sup>3)</sup>, dies nur in geringem Grade der Fall.

b) Die Komplementmenge, die eine bestimmte Blutmenge eben noch zur Lösung bringt, ist imstande, von einer größeren Blutmenge ein vielfaches Multiplum zu lösen<sup>1) 2)</sup> (sofern die Konzentration die gleiche bleibt). Bei der Seife verhält sich dies gerade entgegengesetzt<sup>3)</sup>. Bei Zusatz größerer Blutmengen zu einer Seifenlösung wird eher weniger Blut gelöst als bei geringerem Zusatz. Löste eine Seifenlösung z. B. 5,0 ccm 5-proz. Blutes total, so wurde durch sie von einer 6mal größeren Blutmenge (trotz gleichbleibender Seifenkonzentration) nur eine ganz geringe Spur gelöst. Das Komplement löst, je mehr Blut ihm zugefügt wird, auch desto mehr auf (wenigstens in gewissen Grenzen) und ähnlich verhält sich das Saponin, und wie wir neuerdings feststellten, auch das Solanin. Die Seife zeigt also hierin ein entgegengesetztes Verhalten.

c) In jüngster Zeit hat Gramenitzki<sup>4)</sup> gefunden, daß beim Komplement eine eigenartige Erscheinung beobachtet werden kann, die bei gewissen Fermenten sich ebenfalls findet (z. B. bei Oxydasen und Diastasen). Durch kurze Erhitzung mehr oder minder stark geschädigtes Komplement gewinnt bei längerem Stehen allmählich einen Teil seiner Wirksamkeit ganz von selbst wieder zurück, das Komplement regeneriert sich. Diese Eigenschaft konnte Gramenitzki

1) G. Kiss, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 3, 1909, p. 558.

2) Scheller, Centralbl. f. Bakt., Abt. I, Bd. 56, Heft 2.

3) Liefmann und Andreev, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 11, p. 355.

4) Gramenitzki, Biochem. Zeitschr., 1912.

Zeitschr. f. Immunitätsforschung. Orig. Bd. XIII.

bei durch Erhitzen mehr oder minder inaktivierten Seife-Eiweißmischungen nicht nachweisen, im Gegenteil, die Inaktivierung der Seife schritt bei längerem Stehen nur weiter fort.

d) Schließlich haben Friedemann und Hersfeld<sup>1)</sup> vor kurzem gezeigt, daß an Filtrierpapier angetrocknetes Komplement selbst bei gründlichster Entfettung keine Abnahme seiner hämolytischen Kraft erfährt. Damit stimmen frühere Untersuchungen von Ottolenghi<sup>2)</sup> am gelösten Komplement gut überein. Erst eine sehr langdauernde Extraktion mit Aether schädigte das Komplement, und wir<sup>3)</sup> fanden, daß die Extraktion mit Aether und Alkohol die beiden Teile des Komplementes noch weniger angreift als das ungespaltene Komplement.

Diese Befunde können wir nun noch durch eine Reihe weiterer vermehren.

1) Das Komplement wird durch einen nur wenig gegenüber dem physiologischen erhöhten Kochsalzgehalt ganz beträchtlich in seiner Wirksamkeit gehemmt. Diese Tatsache ist insbesondere von Kiss<sup>4)</sup> sehr sorgfältig untersucht worden. Er fand z. B., daß bei 2-proz. Kochsalzgehalt der Flüssigkeit auch 40 Komplementeinheiten keine Lösung hervorbrachten. Ganz anders ist dies aber bei der Seife, wie wir aus der folgenden Gegenüberstellung ersehen:

I. Versuch mit Seife: 0,01-proz. Seifelösung und Hammelblut. Zusatz steigender Mengen 17-proz. NaCl-Lösung.

No.	Seife 1:10000	0,85-proz. NaCl	17-proz. NaCl	5 Proz. Hammel- blutkörperchen	Total gelöst nach x' bei 37°
1	0,4	ad 2,5	—	0,5	10'
2	0,4	„ 2,5	0,1	0,5	10'
3	0,4	„ 2,5	0,2	0,5	10'
4	0,4	„ 2,5	0,5	0,5	11'
5	0,4	„ 2,5	1,0	0,5	17'
6	0,4	„ 2,5	1,5	0,5	40'

1) U. Friedemann und Hersfeld, Berliner klin. Wochenschr., 1911, No. 47, p. 2106.

2) Ottolenghi und Mori, Centralbl. f. Bakt., Abt. I, Orig., Bd. 38, 1905.

3) l. c.

4) l. c.

II. Die gleichen Mengen 17-proz. NaCl-Lösung zur Komplement-hämolyse zugefügt.

№	Komplement 1 : 10	0,85-proz. NaCl	17-proz. NaCl	Hammelblutkörperchen und Ambozeptor 1:2000 (10 Einheiten) aa	Total gelöst nach
7	0,5	ad 2,5	—	1,0	6'
8	0,5	„ 2,5	0,1	1,0	24 <sup>h</sup> bei 37° un- gelöst
9	0,5	„ 2,5	0,2	1,0	dgl.
10	0,5	„ 2,5	0,5	1,0	„
11	0,5	—	1,0	1,0	„
12	0,5	—	1,5	1,0	„
13	0,5	ad 3,0	—	1,0	6'' total

Wir sehen also eine ungemeine Empfindlichkeit der Komplementwirkung gegenüber dem erhöhten Kochsalzgehalt, während die Seifenwirkung eine nur geringe Verlangsamung erfährt. Wir haben den Einfluß größerer Kochsalzmengen auch bei der Hämolyse durch Saponin studiert. Es ist nicht uninteressant, daß das Saponin sich sowohl vom Komplement wie von der Seife in dieser Hinsicht unterscheidet. Es wird nämlich durch erhöhten Kochsalzgehalt in seiner Wirkung befördert, so daß es doppelt bis 5-fach so stark wirkt als in physiologischer Salzlösung.

Ein weiterer recht auffälliger Unterschied, auf den schon H. Sachs und Altmann<sup>1)</sup> und v. Knafl-Lenz<sup>2)</sup> hingewiesen haben, betrifft die Inaktivierbarkeit des Komplementes und die der Seife-Serummischungen. Während das Komplement, selbst in einer sehr wirksamen Dosis, die mäßig sensibilisierte Blutzellen rasch löst — bei Erwärmung auf 56° in kurzer Zeit inaktiviert wird — braucht eine kräftig lösende Seifen-Serummischung eine langdauernde Erwärmung bis zur völligen Inaktivierung.

Beim Komplement genügt eine 2—3 Minuten lange Erwärmung im Wasserbad bei 56° zur Inaktivierung einer Menge von 1,0 ccm (in einem gewöhnlichen Reagenzglas), während wir bei einer Seife-Serummischung z. B. folgende Resultate erhielten :

- 1) l. c.
- 2) l. c.

No.	Seife 1:1000	Menschen- serum	NaCl	Inaktivierung bei 56° x'	Zusatz von 1,0 2,5-proz. Hammel- blutkörperchen	Total gelöst nach
1	0,8	0,1	0,1	nicht inaktiviert	1,0	5' total
2	0,8	0,1	0,1	2' "	1,0	16' "
3	0,8	0,1	0,1	4' "	1,0	27' "
4	0,8	0,1	0,1	6' "	1,0	28' "
5	0,8	0,1	0,1	10' "	1,0	31' "
6	0,8	0,1	0,1	20' "	1,0	40' "
7	0,8	0,1	0,1	30' "	1,0	46' "

Wie viel milder die Inaktivierung auf Seife-Serummischungen einwirkt als auf das Komplement, erhellt auch aus dem folgenden Versuch:

Fallende Mengen einer Seifenlösung 1:1000 werden mit 0,1 ccm konzentriertem Menschenserum 15 Minuten bei 37° belassen und dann eine halbe Stunde bei 56° inaktiviert. Die Gegenüberstellung mit sonst ganz gleich behandelten, aber nicht inaktivierten Proben ergab das folgende Bild:

Lösung von je 1,0 2,5-proz. Hammelblutes (gewaschen) in 2,0 Gesamtfüssigkeit bei 37°

Seife 1:1000	NaCl 0,85 Proz.	Menschen- serum	a) nach halbstün- diger Inaktivie- rung bei 56° nach	b) nicht inaktiviert nach
0,8	0,1	0,1	Lösung 9' total	5' total
0,6	0,3	0,1	von je 47' "	12' "
0,4	0,5	0,1	1,0 ccm 2 <sup>b</sup> mittel, n. 24 <sup>b</sup> total	2 <sup>b</sup> fast total, n. 24 <sup>b</sup> total
0,2	0,7	0,1	2,5 Ham- 24 <sup>b</sup> ungelöst	24 <sup>b</sup> ungelöst
0,1	0,8	0,1	melblut- 24 <sup>b</sup> "	24 <sup>b</sup> "
0,2	0,8	—	körperch. 3' total	2' total

Wie man sieht, ist der Grad der Inaktivierbarkeit der Seife-Serummischungen nicht entfernt ein so hoher wie der des Komplementes.

Ein letztes Moment, das die Schwierigkeiten der Seifenhypothese zeigt, besteht in den quantitativen Verhältnissen. Bekanntlich wird die Seife in ihrer Wirksamkeit in hohem Grade durch Eiweißstoffe, z. B. die Serumeiweiße, gehemmt. Wie ist es möglich, daß eine Seifenlösung von der Konzentration 1:1000 (in diesem Verhältnis etwa ist die Seife nach Hoppe-Seyler im Serum vorhanden) trotz der großen Menge der neben ihr vorhandenen Eiweißkörper zur Wirksam-



keit gelangt? Weder v. Liebermann noch Noguchi haben bisher irgendeine Tatsache gefunden, die zur Beantwortung dieser Frage dienen könnte<sup>1)</sup>. Die Autoren umgehen eigentlich das Hauptproblem, indem sie bei ihren Versuchen 10—15-mal so große Seifendosen verwenden, als im Serum vorhanden sind. Zudem benutzen sie nur die stärkste der drei im Körper vorhandenen Fettsäuren, die Oelsäure. Die Seifen des Serums sind aber keineswegs nur Salze der Oelsäure, sondern auch der weniger wirksamen Palmitin- und Stearinsäure.

### Zusammenfassung.

Die Hypothese, daß der Stoff im Serum, auf den die Komplementwirkung zurückzuführen ist, die Seife sei, ist in ihrer bisherigen Form nicht genügend begründet. Die folgenden Argumente<sup>2)</sup> lassen sich dagegen erheben:

1) Es fehlt der Beweis, daß Seifenlösungen oder Seifen-Eiweißmischungen ambozeptorbeladene Blutzellen rascher auflösen als nicht beladene. Die von v. Liebermann und von v. Fenyvessy gefundene leichtere Lösbarkeit oft gewaschener sensibilisierter Blutzellen ist (ganz oder teilweise) eine Folge des Waschens — der mechanischen Schädigung, die die sensibilisierten Blutzellen durch diese Prozedur erfahren — nicht aber die Folge der Sensibilisierung.

2) Die Seifeneiweißmischungen sind nicht in der Weise spaltbar, wie es das Komplement ist.

3) Sie binden sich auch an nicht sensibilisierte Blutzellen, während das Komplement dies niemals tut.

4) Die Seifenwirkung ist in viel geringerem Grade von der Konzentration abhängig als die des Komplementes.

5) Bei stärkerem Blutzusatz löst das Komplement mehr Blut, die Seife weniger.

---

1) v. Liebermann glaubt, daß die Sensibilisierung einen derartigen Effekt habe. Aber durch Zusatz von Ambozeptorserum wird ja wieder der Eiweißgehalt der Flüssigkeiten erhöht, und trotzdem löst das Komplement (aber nicht die Seife) die sensibilisierten Blutzellen so rasch auf.

2) Bezüglich der Namen der Autoren, die die einzelnen Tatsachen ermittelten, sei auf die Arbeit selbst verwiesen.

6) Seifen-Eiweißmischungen zeigen nicht das Phänomen der Regeneration, das dem Komplement eigen ist (Gramenitzki).

7) Fettextraktionsmittel verringern die komplettierende Kraft des getrockneten Serums nicht (Friedemann und Herzfeld).

8) Die Komplementwirkung wird durch erhöhten Kochsalzgehalt aufgehoben, die Seifenwirkung wird nur wenig verzögert.

9) Das Komplement ist der Erwärmung auf 56° gegenüber viel empfindlicher als die Seifen-Eiweißmischungen.

10) Es fehlt jede Lösung des Problems, wie die Seife trotz der im Komplement- und Ambozeptorserum vorhandenen Eiweißstoffe zur Wirksamkeit gelangen könnte.

Fügen wir dem noch eine Anzahl früher von verschiedenen Autoren gemachter Einwände hinzu:

11) Seife wirkt in bestimmten Mengen antikomplementär [Hans Sachs und Altmann<sup>1)</sup>].

12) Die Verbindung von Antigen und Antikörper führt nicht zur Seifenbildung [v. Koranyi<sup>2)</sup>].

13) Inaktiviertes Komplement kann durch Seife nicht wieder reaktiviert werden [v. Dungern und Coca<sup>3)</sup>].

14) Bei der Komplementhämolyse bleiben die Schatten der Blutkörperchen erhalten, bei der Seifenhämolyse werden sie gelöst [Neufeld<sup>4)</sup>].

---

#### Nachtrag bei der Korrektur.

In jüngster Zeit sind zwei Arbeiten erschienen, die im Zusammenhang mit dem hier besprochenen Problem stehen. Meyerstein (Deutsches Archiv f. klin. Med., Bd. 106, 1911)

---

1) l. c.

2) v. Koranyi, Biochem. Zeitschr., Bd. 11, 1908.

3) l. c.

4) Neufeld, Arb. aus d. kais. Ges.-Amt, Bd. 28, 1908, Heft 3.

sah bei intravenöser Einspritzung von ca. 10 ccm 1-proz. Natr. oleinic.-Lösung eine bedeutende Zerstörung von roten Blutkörperchen. Er berechnet, daß der Gehalt des Serums an Seife nach der Einspritzung nicht mehr als 0,2 Proz. betragen haben dürfte, gegenüber dem normalen also nur wenig erhöht gewesen sei. Demgegenüber ist aber zu betonen, daß niemals weder bei physiologischen noch bei pathologischen Zuständen ein solcher plötzlicher Einbruch großer und reiner Seifenmengen in die Blutbahn erfolgt, und daß es von vornherein wahrscheinlich ist, daß bei intravenöser Injektion 1-proz. Seife die zunächst getroffenen Blutzellen aufgelöst werden. Die Schlußfolgerungen Meyersteins bezüglich der pathologischen Bedeutung der Seifenanwesenheit im Blute halten wir daher für nicht berechtigt.

Sodann hat Surányi (Berliner klin. Wochenschr., 1912, No. 9) sich gegen die oben erwähnten Versuche Friedemanns und Herzfelds gewandt, mit der Angabe, daß die benutzte Methode nicht geeignet war, das Komplementserum lipoidfrei zu machen. Wenn man dies zugibt, muß man doch berücksichtigen, daß bei Seifenserummischungen vor allem den locker oder garnicht gebundenen Seifenmengen die hämolytische Wirkung zuzuschreiben ist. Gerade diese sind aber leicht extrahierbar. Immer wieder stößt man also auf das Problem: ist es möglich, daß die Seife in der Quantität, die im Serum vorhanden ist, trotz der starken Hemmung durch das Serum-eiweiß, zu hämolytischer Wirkung gelangt? Die Lösung dieser Frage bleiben uns v. Liebermann und seine Schüler bislang schuldig. Freilich ist unserer Ansicht nach die Aufklärung des Komplementproblems in einer anderen Richtung zu suchen.

*Nachdruck verboten.*

[Aus dem chemischen und gerichtschemischen Laboratorium der Government School of Medicine, Kairo, Aegypten.]

**Ueber ein Präzipitin, welches es ermöglicht,  
auch gekochtes (unlösliches) Eiweiß zu differenzieren.**

Von Prof. Dr. W. A. Schmidt.

(Eingegangen bei der Redaktion am 31. Januar 1912.)

In einem früheren Aufsatz<sup>1)</sup> wurde von mir die Frage behandelt, welche Hitzegrade die Eiweißstoffe 1) in wässriger Lösung, 2) in trockenem Zustande vertragen, ohne die Eigenschaft einzubüßen, durch die gewöhnlichen Präzipitinsera (Nativ-Präzipitin) gefällt zu werden. Namentlich die für die Praxis so wichtige Frage der zulässigen Grenze der Erhitzung in wässriger Lösung wurde von mir eingehend untersucht. Die Versuche ergaben, daß die präzipitable Substanz keineswegs so leicht durch Hitze „zerstört“ wird, wie bisher angenommen worden war. Ein 30—60 Minuten langes Erhitzen bei 70° beeinflußt das Serumeiweiß nur wenig; die Reaktionsfähigkeit nimmt nur um etwa 10—30 Proz. ab. (Je größer die Verdünnung der Eiweißlösung, desto größer ist der Einfluß der Hitze.) Erst bei höheren Temperaturen leidet die Reaktionsfähigkeit beträchtlicher. Doch ist es möglich, noch mit 1 Stunde lang bei 90° erhitztem Serum eine genügend deutliche Reaktion zu erzielen, so daß die Differenzierung einer derartig erhitzten Serumlösung (mit dem gewöhnlichen Präzipitin) noch angängig ist. Es konnte somit gezeigt werden, daß die präzipitable Substanz, entgegen den früheren Angaben, eine geradezu hervorragende Hitzebeständigkeit besitzt<sup>2)</sup>.

1) W. A. Schmidt, Studien über Präzipitinreaktion und erhitzte Eiweißstoffe. Biochem. Zeitschr., Bd. 14, 1908, p. 294—348.

2) Diese Resultate sind inzwischen von F. Fornet und M. Müller in ihrer namentlich für die Praxis sehr wichtigen Arbeit Praktische und theoretische Präzipitinuntersuchungen (Zeitschr. f. Hyg., Bd. 66, 1910, p. 215) voll bestätigt werden. Mit ihrer sehr empfindlichen „Schichtprobe“ gelang es ihnen auch noch, mit in 1:100 Verdünnung über freiem Feuer

Aber auch bei solchem Eiweiß, welches durch das Erhitzen dem gewöhnlichen Präzipitin gegenüber reaktionslos geworden ist, ist die antigene Eigenschaft noch keineswegs erloschen, wie man früher anzunehmen schien, sondern sie ist, wie sich dies zuerst durch die Untersuchungen von Obermayer und Pick<sup>1)</sup> herausstellte, nur verändert. Wie meine in dieser Abhandlung wiedergegebenen Versuche zeigen werden, wird die präzipitogene Eigenschaft selbst durch dreistündiges Kochen noch nicht zerstört, und es darf füglich wohl behauptet werden, daß eine Zerstörung allein durch Erhitzen [in wässriger Lösung<sup>2)</sup>] überhaupt kaum möglich ist. Im Anschluß an die Versuche von Obermayer und Pick wurden dann von mir<sup>3)</sup> eingehende Untersuchungen über die präzipitogene Eigenschaft von erhitztem Serum und auch von erhitztem Muskelpreßsaft angestellt, namentlich um festzustellen, inwieweit sich diese Eigenschaften für die Differenzierung von erhitzten Eiweißstoffen verwerten lassen. Die Versuche zeigten, daß es durch Vorbehandlung von Kaninchen mit  $\frac{1}{2}$  Stunde bei 70° erhitztem Serum ohne Schwierigkeit gelingt, ein Präzipitin zu erzeugen, mit welchem selbst gekochtes Serum differenziert werden kann, so lange dieses noch genügend löslich ist, oder durch die Art der Erhitzung<sup>4)</sup> in Lösung geblieben ist. Im Gegensatz zum gewöhnlichen „Nativ“-Präzipitin, welches mit dem höher (d. h. bei 80—90°) erhitzten Serum nur noch schwach und namentlich nur sehr langsam reagiert und bei gekochtem Serum gewöhnlich vollständig versagt, ist dieses „Hitze“-

aufgekochtem Serum eine positive Reaktion zu erhalten. (Ob aber das Serum (selbst in dieser Verdünnung) bei dem kurzen Aufkochen über der Bunsenflamme eine viel intensivere Veränderung erleidet, als bei meinem Versuch, dem einstündigen Erhitzen in 1:10 Verdünnung bei 90°, ist wohl fraglich.)

1) Obermayer und Pick, Wien. klin. Wochenschr., 1903, p. 659.

2) Ueber den Einfluß der Hitze auf trockenes Eiweiß siehe meine Abhandlung l. c. p. 296 ff.

3) l. c. p. 317 ff.

4) Um das Gerinnen des Eiweißes bei der Darstellung dieser Versuchslösungen zu verhüten, wurde das Serum meistens in 1:10 Verdünnung mit physiologischer NaCl-Lösung erhitzt, gewöhnlich noch unter Zusatz von wenigen Tropfen Sodalösung. Vgl. meine Abhandlung, l. c., p. 303.

Präzipitin (ich nannte es damals 70°-Präzipitin) fähig, außer mit nativem und mäßig erhitztem, auch mit 1 Stunde oder länger im kochenden Wasserbade erhitztem Serum kräftige, praktisch verwertbare Reaktionen auszulösen. Vorzugsweise reagiert das Hitzepräzipitin mit Serum, welches, wie die Injektionssubstanz, bei etwa 70° erhitzt worden ist. Fast gleichzeitig mit meinen Untersuchungen erschienen von Fornet und Müller<sup>1)</sup> kurze Angaben über Immunisierungsversuche mit erhitztem Muskeleiweiß, deren Einzelheiten<sup>2)</sup> auch inzwischen veröffentlicht worden sind. Auch die Untersuchungen dieser Autoren, die sich eingehend mit den Be-

1) F. Fornet und M. Müller, Zur Herstellung und Verwendung präzipitierender Sera, insbesondere für den Nachweis von Pferdefleisch, Zeitschr. f. biologische Technik u. Methodik, Bd. 1, 1908, p. 201—206.

2) Zeitschr. f. Hyg., Bd. 66, 1910, p. 215. — Auch von mir wurden, bereits vor meinen Versuchen mit erhitztem Serumeiweiß, Immunisierungsversuche mit erhitztem Muskeleiweiß vorgenommen (siehe die Bemerkungen darüber in meiner Abhandlung, l. c. p. 295 und 318). Durch Berkefeldkerzen filtrierter Pferdemuskelpreßsaft wurde 15—20 Minuten lang bei 70° erhitzt und die entstandene breiige (koagulierte) Masse, die nach dem Zerreiben im Mörser eine nicht zu enge Kanüle leicht passiert, intraperitoneal eingespritzt. Ich erhielt auf diese Weise leicht ein hochwertiges Präzipitin, welches z. B. noch mit dem wenig eiweißhaltigen, klaren Filtrate von 1 Stunde lang bei 90—100° erhitztem Preßsaft vorzüglich reagierte, während ein Nativ-Preßsaft-Präzipitin hier nur eine äußerst schwache Trübung ergab. Die Einzelheiten dieser Versuche wurden von mir deshalb noch nicht veröffentlicht, weil ich hoffte, inzwischen ebenfalls für Muskeleiweiß ein Präzipitin zu erhalten, mit welchem es gelingt, auch völlig unlösliches Muskeleiweiß (z. B. Suppenfleisch) zu differenzieren, was mir jedoch bis jetzt trotz zahlreicher Versuche noch nicht in befriedigender Weise gelungen ist.

Von großem Interesse ist die Beobachtung von Fornet und Müller, daß die von ihnen hergestellten Hitze-Muskeleiweiß-Präzipitinsera weniger streng artspezifisch waren, als die Nativ-Präzipitinsera, indem erstere stärker mit (konzentrierteren) Lösungen von artfremdem Eiweiß reagierten, als dies bei letzteren der Fall ist. Mir ist diese Eigenschaft bei meinen Seren bisher nicht aufgefallen. Dagegen fand ich, daß gerade beim Muskeleiweiß leicht spontane Trübungen auftreten und sich dann auch ein Bodensatz absondert. Es hängt dies mit der mehr oder minder sauren Reaktion (Fleischmilchsäure) fast aller Fleischauszüge zusammen. Falls die Säure nicht vorher neutralisiert wird, können Trübungen schon nach Zusatz eines beliebigen Serums eintreten. (Vgl. meine Angaben hierüber in meiner Abhandlung: Untersuchung über die Erzeugung hochwertiger Muskeleiweiß-Antisera, Biochem. Zeitschr., Bd. 5, 1907, p. 434.)

dürfnissen der Praxis beschäftigen, beweisen in eklatanter Weise die Ueberlegenheit des Hitze-Präzipitins gegenüber dem Nativ-Präzipitin, sobald es sich um die Differenzierung von erhitztem Eiweiß handelt.

Indessen bieten sich in der Praxis viele Fälle, bei denen auch mit dem Hitze-Präzipitin nichts ausgerichtet werden kann, nämlich solche, wo das Eiweiß infolge des Erhitzens völlig unlöslich geworden ist. Hierdurch wird der Anwendung der Präzipitinmethode in der Praxis ja nur zu oft eine Grenze gesetzt. Ich stellte aus diesem Grunde Versuche darüber an, ob es möglich ist, das koagulierte Eiweiß durch chemische Eingriffe in Lösung zu bringen und es dann in der entstandenen Verbindung zu differenzieren. Warme verdünnte Natronlauge schien mir hierfür das geeignetste Lösungsmittel zu sein; Sodalösung erwies sich als unbrauchbar; diese schwachen Alkalien haben ein viel zu geringes Lösungsvermögen. Infolge der Einwirkung von Natronlauge wird das Eiweiß aber derartig verändert, daß die erhaltene Lösung weder mit Nativ- noch mit Hitze-Präzipitin reagiert. (Besondere Versuche, die ich über die Geschwindigkeit dieser Inaktivierung durch Alkalien anstellte<sup>1)</sup>, zeigten, daß schon bei gewöhnlicher Temperatur geringe Mengen von NaOH ausreichen, um das Eiweiß in kurzer Zeit reaktionsunfähig zu machen; bei höherer Temperatur geht die Inaktivierung sehr schnell von statten.) Weitere Versuche sollten nun zeigen, ob es möglich ist, durch Vorbehandlung von Kaninchen mit Serum, welches zunächst erhitzt, dann mit NaOH bis zur Reaktionslosigkeit verändert wird, ein Präzipitin zu erzeugen, welches mit der Injektionssubstanz und namentlich — was von praktischer Wichtigkeit ist — mit unlöslichem aber mit NaOH aufgeschlossenem Serum zu reagieren vermag. Ein Erfolg war hier zunächst zweifelhaft. Denn auf Grund der bekannten Tatsache, daß das Eiweiß durch die Behandlung mit NaOH eine molekulare Veränderung erleidet, war eine damit Hand in Hand gehende völlige Vernichtung der biologischen

1) W. A. Schmidt, Ueber die Geschwindigkeit der Inaktivierung der präzipitablen Substanz durch Alkalien. Biochem. Zeitschr., Bd. 24, 1910, p. 45—52.

Eigenschaft, anstatt nur eine Aenderung derselben zu befürchten. In der Tat traten hier ziemliche Schwierigkeiten auf. Erst nach mehreren Mißerfolgen konnte ein Präzipitin mit den gewünschten Eigenschaften erhalten werden. Bei meinen ersten Immunisierungsversuchen mit durch Hitze und Alkali denaturiertem Serum erhielt ich trotz zahlreicher Injektionen überhaupt kein Präzipitin oder nur ein äußerst schwach wirksames. Der Grund war zweifellos der, daß die Injektionsmasse eine zu intensive Behandlung mit NaOH erfahren hatte, so daß der antigene Charakter gänzlich zerstört war. Bei anderen Versuchen erhielt ich wohl ein kräftiges Präzipitin, doch reagierte dieses, auch nach vielen Injektionen, nur mit erhitztem, nicht aber mit erhitztem und mit NaOH denaturiertem Serum. In letzterem Falle war das für die Injektion benutzte Serum offenbar nicht genügend mit NaOH behandelt worden. Erfolgreich waren die Resultate, wenn die Injektionsflüssigkeit wie im folgenden beschrieben, bereitet wurde. Es soll aber betont werden, daß auch hier das Präzipitin nach den ersten 3—5 Injektionen gewöhnlich fast nur mit erhitztem Serum reagierte und erst nach weiteren Injektionen die Eigenschaft erlangte, ebenfalls durch Hitze + Alkali denaturiertes Serum zu präzipitieren<sup>1)</sup>.

**Bereitung der Injektionsflüssigkeit für das „Hitze-Alkali“-Präzipitin.**

60 ccm Serum (die Versuche wurden mit Pferdeserum vorgenommen) werden mit dem gleichen Volum physiologischer NaCl-Lösung verdünnt und  $\frac{1}{2}$  Stunde im Wasserbade bei 70° erhitzt. Infolge der Verdünnung tritt keine Ausscheidung von koagulierte Eiweiß ein. Jetzt werden 10 ccm normaler Natronlauge hinzugefügt, worauf, bei gleicher Temperatur, 15 bis 20 Minuten lang weiter erhitzt wird. Durch die Einwirkung der Natronlauge wird die etwas dickflüssige graue Masse wieder dünnflüssig und klarer. Eine Abspaltung von Ammoniak ist

1) Diese Versuche sind bereits kurz erwähnt worden in meiner Abhandlung: Präzipitinreaktion und erhitzte Eiweißstoffe, l. c., p. 346. Siehe auch Biochem. Centralbl., Bd. 8, p. 894, ferner meinen Artikel The Specificity of the Serum-Precipitin Reaction of the Proteins, Cairo Scientific Journal, November 1911.



durch den Geruch wahrzunehmen, ein Zeichen der eingetretenen molekularen Veränderung des Eiweißes. Nach Zusatz von 7--8 ccm normaler Salzsäure (wodurch ein geringer Niederschlag von Eiweißgerinnsel entsteht) wird die Masse abgekühlt und — mit dem entstandenen Niederschlag — sofort eingespritzt. Jedes Kaninchen erhält ca. 20 ccm intraperitoneal.

Die Beseitigung der Hauptmenge des Alkalis durch Neutralisation mit HCl schien mir anfangs ratsam. Nach späteren Versuchen zu urteilen, birgt die Injektion einer solch schwach alkalischen Flüssigkeit aber keine Gefahr für die Kaninchen in sich, so daß der Zusatz von HCl ebenso gut unterbleiben kann. Dies bedingt auch den Vorteil, daß der Niederschlag vermieden wird und die Flüssigkeit infolgedessen ohne Filtration auch für intravenöse Injektion geeignet ist.

Die Injektionsmasse wurde von den Tieren gut vertragen und ergab nach 5—10 Injektionen brauchbare Sera. Vorausgesetzt, daß die obigen Angaben befolgt werden, ist die Darstellung eines solchen Hitze-Alkali-Präzipitins, wie ich es bezeichnen möchte, keineswegs schwierig oder mehr als dies sonst bei Präzipitinseren der Fall ist, von Zufälligkeiten abhängig, was für die Verwendung dieses Präzipitins in der Praxis entschieden von Vorteil ist.

Um die Leistungsfähigkeit des Hitze-Alkali-Präzipitins zu beweisen, will ich gleich folgenden Versuch anführen, bei dem das Präzipitin auf eine Probe gestellt wird, wie sie schärfer wohl kaum verlangt werden kann. Wie ich erwähnte, war es mein Bestreben, ein Mittel zu schaffen, um auch solche Eiweißstoffe zu differenzieren, welche infolge von Hitze in den bisher einzig zulässigen indifferenten Lösungsmitteln (NaCl- oder NaCl-Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung) ganz unlöslich geworden sind. Das *experimentum crucis* ist folgendes:

Pferdeserum, mit etwas Wasser verdünnt, wird in kochendem Wasser 3 Stunden lang erhitzt. Das Koagulum wird, um jegliche Spur von löslichem Eiweiß zu entfernen, sehr gründlich mit NaCl-Lösung ausgewaschen, dann getrocknet und pulverisiert. Durch entsprechende Versuche überzeugt man sich, daß dieses Pulver in NaCl-Lösung ganz unlöslich ist. (NaCl-Lösung, welche längere Zeit mit dem Serumpulver geschüttelt worden ist, darf nicht mit dem Hitze-Präzipitin

reagieren.) Eine Messerspitze voll von diesem Serum wird nun im Reagenzglase mit ca. 10 ccm einer NaCl-haltigen,  $\frac{1}{10}$  normalen Natronlauge übergossen und unter zeitweiligem Schütteln 10—20 Minuten lang im Wasserbade bei 60—70° erwärmt. Das Serum quillt auf und geht langsam in Lösung. Wegen der gleich noch näher zu erörternden Gefahr der Vernichtung der Reaktionsfähigkeit des Eiweißes durch zu langes Erwärmen mit NaOH, ist es ratsam, nicht abzuwarten, bis sich alles Serum gelöst hat, sondern man gießt die Masse, sobald man sieht, daß genügend in Lösung gegangen ist, in etwas kalte NaCl-Lösung filtriert und neutralisiert mit verdünnter, am besten etwa  $\frac{1}{20}$  normaler Salzsäure, bis die mit Phenolphthalein versetzte Lösung nur noch schwach rot gefärbt ist<sup>1)</sup>. Für den Präzipitinversuch wird die Lösung eventuell noch weiter verdünnt. Mit dieser Eiweißlösung, von der man auf Grund des Herstellungsverfahrens sicher ist, daß sie nur durch NaOH aufgeschlossenes Eiweiß enthält, reagiert das Hitze-Alkali-Präzipitin vorzüglich; es erfolgt auch in ziemlich verdünnter Lösung sofortige Trübung und schon nach wenigen Minuten Flockenbildung. — Besondere Versuche ergaben, daß die Reaktionen des Hitze-Alkali-Präzipitins in gleicher Weise artspezifisch sind, wie die des Nativ-Präzipitins. Es scheint somit, daß, solange ein mit Chemikalien mißhandeltes Eiweiß überhaupt noch antigenen Charakter besitzt, auch die Artspezifität erhalten bleibt.

Der eben erwähnte Versuch beweist die Anwendungsmöglichkeit dieses Präzipitins für den genannten Zweck. In der Tat ist dieses Präzipitin das einzige sichere Mittel, welches uns zurzeit für die Differenzierung von gekochtem, unlöslichem Eiweiß zur Verfügung steht. Das anaphy-

1) Bei allen diesen Versuchen muß das Alkali vor dem Zusatz des Präzipitins stets sorgfältig bis zur schwach alkalischen Reaktion neutralisiert werden, wegen der bekannten Tatsache, daß das Reaktionsprodukt in Alkalien löslich ist. Siehe auch meine Abhandlung in Biochem. Zeitschrift, Bd. 24, 1910, p. 52. Sollte man durch Unvorsichtigkeit zu viel Salzsäure hinzugefügt haben, so versetzte man die (durch den Ueberschuß von HCl leicht getrübe) Lösung sofort wieder mit ein bis zwei Tropfen einer verdünnten Natronlauge, worauf die etwa entstandene Trübung verschwindet. Die Reaktionsfähigkeit des Eiweißes leidet durchaus nicht durch diese Mißhandlung.

laktische Phänomen, welches bekanntlich von verschiedenen Autoren hierfür in Vorschlag gebracht wurde, ist, ganz abgesehen von der Umständlichkeit und Kostspieligkeit dieses Verfahrens, viel zu unsicher. Uhlenhuth und Haendel<sup>1)</sup>, welche eingehende Studien über die praktische Verwendbarkeit der Anaphylaxie gemacht haben, betonen, „daß die Anaphylaxiereaktion zum Nachweis von gekochtem Eiweiß nur mit großer Vorsicht in der Praxis zu verwerten ist“.

In folgender Tabelle gebe ich einen Ueberblick über die allgemeinen Reaktionen des Hitze-Alkali-Präzipitins, verglichen mit denen des Nativ-Präzipitins und des vorhin erwähnten Hitze-Präzipitins. Die Resultate dieser Tabelle zeigen in interessanter Form, in welchem Grade die Eigenschaften des Präzipitins durch chemische und physikalische Aenderungen der Injektionssubstanz beeinflußt werden können.

Tabelle I.

Reaktionsfähigkeit des Hitze-Alkali-Präzipitins verglichen mit der des Nativ- und des Hitze-Präzipitins.

Lösung von	+ Nativ-Präzipitin	+ Hitze-Präzipitin	+ Hitze-Alkali-Präzipitin
nativem Serum	starke Reaktion	gute Reaktion	0 (nur äußerst geringe Trübung)
70°-Serum (30 Min. erhitzt)	gute Reaktion	starke Reaktion	starke Reaktion
100°-Serum (30 Min. erhitzt) <sup>2)</sup>	0	gute Reaktion	dgl.
70°-Serum, inaktiviert durch NaOH. (Injektionsflüssigkeit für Hitze-Alkali-Präzip.)	0	0	dgl.
gekochtem, unlöslichem Serum, mit NaOH aufgeschlossen	0	0	gute Reaktion
nativem Serum, in der Kälte mit NaOH behandelt	0	0	starke Reaktion

1) Uhlenhuth und Haendel, Untersuchungen über die praktische Verwertbarkeit der Anaphylaxie zur Erkennung und Unterscheidung verschiedener Eiweißarten. Zeitschr. f. Immunitätsf. u. exper. Therapie, Bd. 4, p. 771. Siehe hier auch die einschlägige Literatur.

2) Ueber die Bereitung dieser Versuchslösung siehe Anmerkung 4 auf p. 167 dieser Abh.

Diese Reaktionen seien hier noch kurz besprochen.

Zunächst ist die für die praktische Anwendung des Hitze-Alkali-Präzipitins wichtige Tatsache hervorzuheben, daß es nicht allein mit der Injektionssubstanz, dem durch Hitze und Alkali denaturierten Serum reagiert, sondern ebenfalls — ja noch besser — mit Serum, welches nur erhitzt worden ist. Dagegen ist dieses Präzipitin nicht imstande, natives Serum zu fällen, was das Hitze-Präzipitin vermag. Infolge der Alkalidenaturierung des erhitzten Serums hat das damit erzeugte Präzipitin also eine Eigenschaft gewonnen: die Wirksamkeit auf durch Hitze + durch Alkali denaturiertes Serum, und eine Eigenschaft eingebüßt: die Fällung von nativem Serum. Aber auch in der beiden Präzipitinen gemeinsamen Eigenschaft, erhitztes Serum zu präzipitieren, besteht ein interessanter Unterschied: während das Hitze-Präzipitin, wie bereits erwähnt, vornehmlich das bei 70—75° erhitzte und merklich weniger 100°-Serum präzipitiert, also am besten mit Eiweiß reagiert, welches eine gleiche Erhitzung erfahren hat, wie die Injektionssubstanz, hat das Hitze-Alkali-Präzipitin die Fähigkeit, 70°- und 100°-Serum etwa gleich stark zu fällen. Bemerkenswert sind noch folgende Punkte. Hinsichtlich der an anderer Stelle<sup>1)</sup> ausführlich von mir erörterten Tatsache, daß  $\frac{1}{2}$  Stunde bei 70° erhitztes Serum durch Nativ-Präzipitin noch ausgezeichnet gefällt wird, woraus man schließen sollte, daß zwischen 70°-Serum und nativem Serum nur ein geringfügiger Unterschied bestehe, ist es schwer zu verstehen, daß das Hitze-Alkali-Präzipitin mit 70°-Serum sehr stark, dagegen mit nativem Serum praktisch gar nicht reagiert. Sobald aber natives Serum, auch bei gewöhnlicher Temperatur, mit NaOH behandelt wird, reagiert es sofort mit dem Hitze-Alkali-Präzipitin. Kurz zusammengefaßt: das Hitze-Alkali-Präzipitin reagiert sowohl mit Serum, welches durch Hitze und Alkali zusammen, als auch mit Serum, welches nur durch Hitze und nur durch Alkali denaturiert worden ist.

Was die Haltbarkeit des Hitze-Alkali-Präzipitins angeht, so möchte ich bemerken, daß die in Tabelle I ange-

1) W. A. Schmidt, Biochem. Zeitschr., Bd. 14, 1908, p. 308.

führten Versuche jetzt mit von zwei verschiedenen Kaninchen gewonnenen Seren nachgeprüft wurden, welche bereits 1½ Jahre alt sind. Soweit sich jetzt beurteilen läßt, haben die Sera inzwischen nichts, oder nur sehr wenig, von ihrer ursprünglichen Wirksamkeit eingebüßt. Dagegen machte ich die merkwürdige Beobachtung, daß das noch übriggebliebene Serum einer anderen früheren Kaninchenserie, welches bei der Gewinnung und einige Monate später die Eigenschaften des Hitze-Alkali-Präzipitins in ausgesprochenem Maße besaß, nach einem Jahre nur noch erhitztes Eiweiß präzipitierte, und zwar dieses anscheinend ebenso kräftig wie früher, aber die Eigenschaft, mit durch NaOH denaturiertem Serum zu reagieren, fast vollständig verloren hatte. Diese Beobachtung ist deswegen von Interesse, weil sie darauf schließen läßt, daß das Hitze-Alkali-Präzipitin aus zwei verschiedenen Präzipitinen besteht. (Siehe p. 180 dieser Abh.)

Die Tatsache, daß natives Serum erst durch Behandlung mit NaOH für das Hitze-Alkali-Präzipitin reaktionsfähig wird, veranlaßte einige weitere Versuche, um festzustellen, wie schnell dies erfolgt, namentlich um die Geschwindigkeit dieser Aktivierung des Serums gegenüber Hitze-Alkali-Präzipitin vergleichen zu können mit der bei dieser Behandlung gleichzeitig stattfindenden Inaktivierung gegen Nativ-Präzipitin, welche ich ausführlich an anderer Stelle<sup>1)</sup> beschrieben habe. Die Versuche wurden in folgender Weise vorgenommen:

10 ccm Serum (Pferdeserum) wurden bei Zimmertemperatur mit 80 ccm NaCl-Lösung und 10 ccm normaler NaOH vermischt. Es handelte sich somit im Gemisch um die Einwirkung von 1/10 normaler NaOH auf 1:10 verdünntes Serum. Unmittelbar nach der Mischung und dann zu verschiedenen Zeiträumen wurden 10 ccm dieses Gemisches herausgenommen, sofort mit NaCl-Lösung verdünnt, mit HCl und Phenolphthalein (bis zur schwach rötlichen Färbung) neutralisiert und dann auf 100 ccm aufgefüllt. Diese nunmehr 1:100-Serumlösungen wurden dann 1) mit dem Hitze-Alkali-Präzipitin, 2) mit Nativ-Präzipitin untersucht. Die jeweilige Reaktionsfähigkeit der Serumlösungen ist in Prozenten derjenigen Niederschlagsmenge ausgedrückt, welche mit jedem Präzipitin bei der Optimumreaktion erhalten wurde.

1) W. A. Schmidt, Biochem. Zeitschr. Bd. 24, 1910, p. 47.

Tabelle II.

Die Geschwindigkeit der bei der Behandlung von nativem Serum mit NaOH eintretenden Aktivierung gegenüber Hitze-Alkali-Präzipitin und der gleichzeitigen Inaktivierung gegenüber Nativ-Präzipitin.  
(Bei Zimmertemperatur.)

1:100-Lösung von	Reaktionsfähigkeit mit	
	Hitze-Alkali-Präz.	Nativ-Präzipitin
Serum <i>ohne</i> NaOH-Behandlung (Vergleichslösung)	0	[100]
Serum, <i>mit</i> NaOH behandelt:		
direkt nach der Mischung	40	80
nach 5 Min. Einwirkung	60	60
„ 30 „	90	15
„ 1 Std. „	100	5
„ 2 „ „	100	3
„ 4 „ „	100	fast 0
„ 9 „ „	75	0
„ 16 „ „	40	—
„ 24 „ „	30	—
„ 48 „ „	15	—
„ 96 „ „	5	—

Ogleich die Zahlen nur ganz rohe Schätzungen der Niederschlagsmengen darstellen, so zeigen sie doch in deutlicher Form, daß ungefähr mit derselben Geschwindigkeit, wie die Reaktionsfähigkeit des mit NaOH behandelten Serums gegen Nativ-Präzipitin abnimmt, sie dem Hitze-Alkali-Präzipitin gegenüber zunimmt. Sobald die Reaktionsfähigkeit mit Nativ-Präzipitin vollständig erloschen ist, reagiert das Hitze-Alkali-Präzipitin am kräftigsten. Diese Maximum-(resp. Minimum-)Reaktion tritt bereits nach etwa 30 Minuten langer Einwirkung des NaOH ein und bleibt dann mehrere Stunden hindurch konstant. Nach längerer Behandlung mit NaOH reagiert das Serum aber wieder weniger gut mit dem Hitze-Alkali-Präzipitin, was offenbar darauf zurückzuführen ist, daß das Eiweiß durch das NaOH weitere Veränderungen erleidet, allmählich in Verbindungen übergeführt wird, welche auch mit dem Hitze-Alkali-Präzipitin nicht mehr reagieren und wohl überhaupt keine antigenen Eigenschaften mehr haben. Doch nimmt die Reaktionsfähigkeit nur ganz allmählich ab; selbst nach 4-tägiger Einwirkungsdauer ( $\frac{1}{10}$  NaOH auf 1:10 verdünntes Serum!) ist noch immer eine sehr deutliche Reaktion (ca. 5 Proz.) wahrzunehmen.

Das in dieser Abhandlung beschriebene Immunisierungsprodukt habe ich auf Grund der Behandlungsart der Injektionsflüssigkeit als Hitze-Alkali-Präzipitin bezeichnet. Dürfen wir es schon direkt Alkalialbuminat-Präzipitin nennen? Diese Frage, ob wirkliches Alkalialbuminat, d. h. durch Behandlung mit Alkali entstandenes nicht mehr koagulables Eiweiß noch präzipitogenen Charakter hat, ist für die Eiweißchemie entschieden von Interesse, so daß es sich wohl lohnt, etwas näher auf diesen Punkt einzugehen. Denn zutreffenden Falles würde dies ja bedeuten, daß das Eiweiß selbst den Verlust verschiedener Gruppen (Abspaltung von Ammoniak und Schwefel durch die Natronlauge) verträgt, ohne seine antigene Eigenschaft einzubüßen.

Um welche Zustandsänderung des Eiweißes handelt es sich nun bei der in der beschriebenen Weise behandelten Injektionsmasse? Besteht diese ganz aus Alkalialbuminat, oder enthält sie nebenbei noch Uebergangsstufen? Auf Grund der Tatsache, daß die von mir beobachtete Geschwindigkeit der Inaktivierung<sup>1)</sup> einer mit NaOH behandelten Serumlösung gegenüber Nativ-Präzipitin ungefähr übereinstimmt mit der Geschwindigkeit, mit welcher nach chemischen Angaben<sup>2)</sup> die Alkalialbuminatlösung erfolgen soll, glaubte ich zunächst annehmen zu müssen, daß eine mit NaOH behandelte (native oder erhitzte) Serumlösung dann als vollständig in Alkalialbuminat umgewandelt betrachtet werden könne, sobald die Reaktionsfähigkeit des Eiweißes mit Nativ- resp. Hitze-Präzipitin völlig aufgehört hat. Bei der Bereitung der Injektionsflüssigkeit für das Hitze-Alkali-Präzipitin wurde nun das Serum tatsächlich so lange — und nicht länger — mit NaOH behandelt, bis es nicht mehr mit diesen Präzipitinen reagierte. Aber meine weitere Beobachtung, daß eine derartig behandelte Serumlösung noch koagulables Eiweiß enthält, beweist schon, daß die Reaktionslosigkeit gegenüber Nativ- und Hitze-Präzipitin noch nicht als Kriterium für die gänzliche Umwandlung in Alkalialbuminat gelten darf. Es zeigt sich somit, daß bei vorsichtiger Behandlung von Serum

1) W. A. Schmidt, Biochem. Zeitschr., Bd. 24, 1910, p. 47.

2) Siehe Cohnheim, Chemie der Eiweißkörper, 1904, p. 139.

mit NaOH sich neben Alkalialbuminat eine Zwischenstufe bildet, welche zwar auch nicht mehr mit den genannten Präzipitinen reagiert, aber doch noch koagulabel ist. Und man könnte wegen der gleich zu erwähnenden Resultate zunächst der Ansicht sein, daß die präzipitogene Eigenschaft der Injektionsflüssigkeit eben nur dieser Uebergangsstufe, nicht dem wirklichen Alkalialbuminat, zuzuschreiben sei.

Denn daß andererseits solche Alkalidenaturierungsprodukte, die chemisch zweifellos als Alkalialbuminat anzusprechen sind, im allgemeinen keinen antigenen Charakter mehr haben, ergibt sich aus anderen Immunisierungsversuchen. Bereits vor mehreren Jahren stellte ich eingehende Versuche an mit einem Muskeleiweiß-Präparat, welches folgendermaßen dargestellt wurde:

$\frac{1}{2}$  Kilo zerhacktes fettfreies Fleisch wurde  $\frac{1}{2}$  Stunde lang gekocht, das Wasser durch Auspressen entfernt und das gekochte Fleisch dann in 500 ccm siedende 0,5-proz. (ca.  $\frac{1}{10}$  normale) Natronlauge eingetragen. Nach 5 Minuten langem Kochen wurde das von der Natronlauge Gelöste abgessen und noch heiß mit so viel Essigsäure versetzt, als noch ein Niederschlag entstand. Dieser wurde abfiltriert, erst mit Wasser, dann mit Alkohol ausgewaschen und zuletzt, zur Trocknung, mit Aether verrieben. Es resultiert ein gelblich-braunes Pulver.

Dieses Präparat muß auf Grund der Herstellungsweise doch wohl als Alkalialbuminat bezeichnet werden, jedenfalls hauptsächlich daraus bestehen. Trotz wiederholter Versuche gelang es mir nicht, ein brauchbares Präzipitin damit zu erzeugen <sup>1)</sup>. Bei diesem Alkalialbuminat ist der antigene Charakter

1) Siehe hierüber meine Abh.: Untersuchungen über die Erzeugung hochwertiger Muskeleiweiß-Antisera für die Fleischdifferenzierung, l. c. p. 426 und meine Abh.: Studien über Präzipitinreaktion und erhitzte Eiweißstoffe, l. c. p. 317. Von anderen Autoren, zuerst von A. Schütze (Zeitschr. f. Hygiene, Bd. 38, p. 487) ist indessen behauptet worden, daß ein derartig hergestelltes Muskeleiweißpräparat noch Präzipitin erzeuge. Piorkowski (Ber. d. Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, 12. Jahrg., Heft 1; Centralbl. f. Bakt., Abt. I, Bd. 31, p. 550) verfolgte dann praktische Zwecke und erhielt angeblich nach 14-tägiger Behandlung eines Kaninchens mit 15 g dieses aus Pferdefleisch hergestellten Präparates ein Präzipitin, welches sogar natives Pferdemuskeleiweiß (frischen Fleischauszug) präzipitierte und folglich für die Erkennung von nativem Pferdefleisch Verwendung finden sollte! Nach allen meinen Erfahrungen mit denaturiertem Eiweiß beruhen namentlich die Angaben Piorkowskis



so gut wie vollständig erloschen. Auch Pferdeserum, welches eine gleiche Behandlung erfahren hatte, ergab kein Präzipitin und reagierte bezeichnenderweise auch nicht mit dem Hitze-Alkali-Präzipitin, selbst dann nicht, oder nur äußerst schwach, wenn die Serumflüssigkeit nach dem 5 Minuten langen Kochen in der  $\frac{1}{10}$  normalen Natronlauge sofort stark verdünnt wurde, um die NaOH-Wirkung schnell aufzuheben. Aber auch das bei 70° mit NaOH behandelte Serum reagiert, wie bereits erwähnt, dann nicht mehr mit dem Hitze-Alkali-Präzipitin, wenn die Behandlung zu lange fortgesetzt wird. Und, wie die Tabelle II deutlich zeigt, nimmt ebenfalls die Reaktionsfähigkeit des bei Zimmertemperatur mit NaOH behandelten Serums nach längerer Einwirkungsdauer wieder ab.

Nach diesen letzteren Versuchen zu urteilen, scheint es, wie gesagt, als wenn wirkliches Alkalialbuminat, d. h. nicht mehr koagulables Eiweiß, keinen präzipitogenen Charakter mehr habe und daß somit das Hitze-Alkali-Präzipitin seine Entstehung, wie schon angedeutet, allein dem noch koagulablen Anteil der Injektionsmasse (dem Uebergangsprodukt) verdanke. Aber dem widersprechen folgende Tatsachen: Die Kraftprobe des Hitze-Alkali-Präzipitins besteht ja darin, daß es imstande ist, 3 Stunden lang gekochtes und daher völlig unlösliches, mit NaOH aufgeschlossenes Serum vorzüglich zu fällen. Und dieses durch NaOH in Lösung gebrachte Serum enthält sicherlich kein koagulables Eiweiß mehr und muß zweifellos als Alkalialbuminat bezeichnet werden. Also reagiert das Präzipitin doch mit unter gewissen Kautelen hergestelltem Alkalialbuminat. Ferner erinnere ich daran (siehe p. 170 dieser Abhandl.), daß das Hitze-Alkali-Präzipitin zunächst nur mit erhitztem und erst nach weiteren Injektionen auch mit dem durch Alkali aufgeschlossenen Serum reagierte. Hieraus kann meines Erachtens nur der Schluß gezogen werden, daß auch der nicht mehr koagulable Anteil der Injektionsflüssigkeit (das wirkliche Alkalialbuminat) an der Präzipitinbildung teilgenommen hat.

ganz bestimmt auf einen Irrtum. Selbst wenn es gelingen sollte, mit dem Präparat ein einigermaßen wirksames Präzipitin zu erzeugen, so würde dieses doch niemals mit frischem, nativem Eiweiß reagieren. (Siehe die Eigenschaft des Hitze-Alkali-Präzipitins.)

Das Hitze-Alkali-Präzipitin besteht somit aus zwei verschiedenen Präzipitinen: der noch koagulable Anteil hat stärkere präzipitogene Eigenschaften und ergibt schon nach wenigen Injektionen ein Präzipitin, welches mit erhitztem Serum (und vielleicht nur mit diesem) reagiert, der nicht koagulable Anteil, welcher schwächere präzipitogene Eigenschaften hat, erzeugt — und zwar erst nach längerer Vorbehandlung — ein Präzipitin, welches das durch NaOH veränderte Serum zu präzipitieren vermag. Nur auf diese Weise lassen sich die eben erwähnten Tatsachen und auch folgende Beobachtung meiner Ansicht nach in befriedigender Art erklären. Wie ich schon erwähnte, hatte eines meiner Hitze-Alkali-Präzipitinsera nach längerer Aufbewahrung *eine* seiner Eigenschaften, nämlich das durch NaOH veränderte Serum zu präzipitieren, verloren, während die *andere* (ausgeprägtere) Eigenschaft, die Reaktionsfähigkeit mit nur erhitztem Eiweiß erhalten blieb <sup>1)</sup>.

Jedenfalls ergibt sich aus diesen Versuchen, daß die durch Behandlung mit starken Alkalien entstandenen Produkte sich je nach der Intensität der Alkalibehandlung in präzipitogener Hinsicht verschieden verhalten. Sicherlich bilden sich, je nach der Einwirkungsdauer und der Temperatur,

1) Fornet und Müller (l. c.) sind auf Grund ihrer Versuche mit erhitztem Fleischsaft der Ansicht, daß das *in vitro* ausfällbare Eiweiß thermostabiler sei, als das *in vivo* präzipitinbildende. Denn sie fanden, daß Fleischsaft, welcher höheren Temperaturen als 86° ausgesetzt worden war, nicht mehr präzipitogen wirkte, während er erst viel später die Fähigkeit verliert, mit dem Präzipitin zu reagieren. Ich glaube aber nicht, daß meine Versuche über die Alkaliresistenz in ähnlicher Weise erklärt werden dürfen, daß nämlich das wirkliche Alkalialbuminat zwar noch imstande sei, mit dem von dem koagulablen Anteil der Injektionsflüssigkeit erzeugten Präzipitin zu reagieren, aber selbst nicht mehr die Fähigkeit habe, im Tierkörper Präzipitin zu bilden. Mit anderen Worten, ich möchte vorläufig noch bei der alten Auffassung bleiben, daß ein Eiweißprodukt, welches noch mit einem Präzipitin zu reagieren vermag, auch noch fähig sein wird, *in vivo* Präzipitin zu erzeugen. Nebenbei bemerkt, möchte ich den Resultaten von Fornet und Müller auch eher die Deutung geben — jedenfalls glaube ich, daß sie zum Teil darauf zurückzuführen sind — daß nämlich der bei 86° erhitzte Fleischsaft zu unlöslich geworden ist und deswegen viel zu langsam resorbiert wird, um Präzipitin zu erzeugen, während die Spuren des löslich gebliebenen Eiweiß für die Präzipitinreaktion *in vitro* noch reichlich genügen.

eine ganze Reihe von „Albuminaten“, deren chemische Verschiedenheit sich nur wegen der Riesengröße des Eiweißmoleküls nicht nachweisen läßt. Von diesen haben nur die durch vorsichtige Behandlung mit NaOH entstandenen Produkte noch präzipitogenen Charakter. Bei intensiverer Einwirkung wird die antigene Gruppe abgespalten. Offenbar geschieht dies schon viel früher, als die Spaltung in einfachere Produkte (Albumosen etc.) stattfindet <sup>1)</sup>).

Immerhin aber verträgt das Eiweiß schon eine beträchtliche Mißhandlung, wie namentlich der Versuch beweist, daß gekochtes Serum, bei 70° in  $\frac{1}{10}$  normaler NaOH aufgelöst, noch ausgezeichnet reagiert. Man sollte annehmen, daß gerade bei diesem Lösungsprozeß weitgehende chemische Veränderungen vor sich gingen, und ich hielt es wegen der Gefahr der völligen Vernichtung der Reaktionsfähigkeit auch für angebracht (siehe p. 172), das unlösliche Serum nicht länger als nötig (d. h. nur etwa 10—15 Minuten) mit der heißen Natronlauge in Berührung zu lassen. Doch bekam ich, was ich besonders betonen möchte, auch nach 30 Minuten langer Einwirkung der Natronlauge kaum weniger günstige Resultate. Dies ist wohl darauf zurückzuführen, daß bei der Wechselwirkung zwischen dem unlöslichen Serum und der Natronlauge sich stets wieder neue Mengen von (mit Hitze-Alkali-Präzipitin) reaktionsfähigem Eiweiß bilden, wenn auch das vorhin gelöste allmählich reaktionsunfähig wird. Die Menge des reaktionsfähigen Eiweiß muß daher, solange noch unlösliches Serum vorhanden ist, die gleiche bleiben. Also gerade bei der Differenzierung von unlöslichem Eiweiß, wofür dieses Präzipitin ja hauptsächlich verwendet werden soll, ist die Gefahr der Vernichtung der Reaktionsfähigkeit durch das NaOH am geringsten <sup>2)</sup>).

1) Daß Albumosen keinen präzipitogenen Charakter mehr haben, ergibt sich hieraus von selbst. Castellani will indessen durch Injektionen von Somatose ein Präzipitin erhalten haben. Vergleiche hierüber meine negativen Resultate in meinem Artikel: Woraus besteht Fleischsaft Puro? Med. Klinik, 1908, No. 21.

2) Es darf allerdings keine stärkere Natronlauge als etwa  $\frac{1}{10}$  normale genommen werden.  $\frac{1}{2}$  normale löst das Eiweiß, wie speziell hierauf gerichtete Versuche zeigten, zwar besser, doch reagiert die Lösung weniger gut.

Daß die antigene Eigenschaft des Eiweiß von den an OH-Ionen armen Lösungen der schwachen Alkalien, wie Ammoniak und Natriumkarbonat, bedeutend weniger verändert resp. geschädigt wird, daß ihre Wirkung, mit der des Natriumhydroxyds verglichen, verschwindend klein ist, darauf habe ich bereits früher hingewiesen<sup>1)</sup>. Bei Zimmertemperatur vermögen diese schwachen Alkalien dem Eiweiß nicht einmal die Reaktionsfähigkeit mit Nativ-Präzipitin zu nehmen. Meine Versuche, unlösliches Eiweiß durch diese weniger eingreifenden Alkalien in Lösung zu bringen, mißlingen aber; sie haben, auch bei 70°, ein viel zu geringes Lösungsvermögen, weswegen die erhaltenen Lösungen nur sehr schwach mit dem Hitze-Alkali-Präzipitin reagierten. Natriumhydroxyd ist daher das einzige in Betracht kommende Lösemittel, und bei einigermaßen sorgfältiger Anwendung ist, wie aus dem vorher Gesagten hervorgeht, eine Zerstörung der Reaktionsfähigkeit auch so gut wie ausgeschlossen.

Ueber die Verwendung des Hitze-Alkali-Präzipitins in der Praxis sei noch folgendes hinzugefügt. Es wird in allen den Fällen vorzügliche Dienste leisten, wo das Nativ-Präzipitin versagt, sei es wegen der durch die Erhitzung des Eiweißes eingetretenen Reaktionslosigkeit des vielleicht noch genügend löslichen Eiweißes, oder sei es, daß das Eiweiß in den üblichen Lösungsmitteln überhaupt ganz unlöslich geworden ist. Zu der Behandlung des zu differenzierenden Eiweißes mit Natronlauge ist nur im Notfalle zu greifen. Zunächst wird man, wie bisher, stets versuchen, ob das erhitzte Eiweiß in NaCl-Lösung noch genügend löslich ist und zutreffenden Falles diese Lösung, wenn sie nicht mehr mit Nativ-Präzipitin reagieren sollte, direkt mit Hitze-Alkali-Präzipitin versuchen. Denn letzteres reagiert ja, wie gezeigt wurde, auch mit Eiweiß, welches nur durch Hitze (ohne Alkali) denaturiert worden ist; mit diesem sogar am besten. Durch das Hitze-Alkali-Präzipitin ist das Hitze-Präzipitin somit ganz überflüssig geworden. Nur dann, wenn sich das Eiweiß in NaCl-Lösung ganz unlöslich oder ungenügend löslich erwiesen

1) W. A. Schmidt, Einige Versuche über die Geschwindigkeit der Inaktivierung der präzipitablen Substanz durch Alkalien, l. c.

hat, behandle man dasselbe, wie p. 170 beschrieben, mit warmer  $\frac{1}{10}$  normaler Natronlauge und versuche, ob die somit erhaltene Lösung mit dem Hitze-Alkali-Präzipitin reagiert. In der Möglichkeit, das Eiweiß auch in solchen extremen Fällen noch differenzieren zu können, liegt der eminente Vorteil dieses Präzipitins.

Wie ich bereits erwähnte<sup>1)</sup>, habe ich versucht, auch für Muskeleiweiß ein gleichartiges Präzipitin herzustellen, weil es sich in der Praxis ja meistens um die Differenzierung von Fleisch und Fleischprodukten handelt. Ich hatte mir die Aufgabe gestellt, ein Präzipitin zu erzeugen, mit welchem es gelingt, selbst stark gekochtes, in NaCl-Lösung ganz unlösliches Fleisch (Pferdefleisch) noch zu differenzieren. Diese Versuche hatten aber bis jetzt keinen sonderlichen Erfolg. Das erhaltene Präzipitin unterschied sich anscheinend nur wenig vom Hitze-Fleischpreßsaft-Präzipitin, d. h. es reagierte zwar ausgezeichnet mit erhitztem, noch löslichem Preßsaft, aber nur in sehr geringem Maße mit in NaOH aufgelöstem, stark gekochtem Fleisch. In weitaus den meisten in der Praxis vorkommenden Fällen, bei denen die Differenzierung von völlig unlöslichem Fleischeiweiß in Frage kommt, wird aber auch das beschriebene, mit Serumeiweiß erzeugte Hitze-Alkali-Präzipitin genügen, wie ein Versuch mit einer 45 Minuten in siedendem Wasser erhitzten, 25 Proz. Pferdefleisch enthaltenen Wurst bewies. Denn hier erhielt ich mit diesem Präzipitin noch ein sehr brauchbares Resultat. Das stark gekochte Suppenfleisch reagierte allerdings nicht mehr. Das günstigere Resultat mit der gekochten Wurst ist offenbar darauf zurückzuführen, daß wegen der Darmhülle (und des direkten Einlegens in kochendes Wasser) das Serumeiweiß [denn nur dieses reagiert ja mit dem Serumeiweiß-Präzipitin<sup>2)</sup>] weniger ausgelaugt wird, als dies bei dem Kochen des Fleisches der Fall ist, welches noch dazu kalt aufgesetzt wurde. Man wird in der Praxis aber wohl selten in die Verlegenheit kommen, Suppenfleisch differenzieren zu müssen.

1) Siehe Anmerkung 2, p. 168 dieser Abhandlung.

2) Siehe die Versuche in meiner Abhandlung: Untersuchung über die Erzeugung hochwertiger Muskeleiweiß-Antisera, I. c., p. 430 ff.

### Zusammenfassung.

Die Differenzierung von erhitztem Eiweiß ist mit unseren bisherigen Mitteln, Nativ- und Hitze-Präzipitin, bekanntlich nur dann noch möglich, wenn das Eiweiß in den bisher einzig zulässigen indifferenten Lösungsmitteln noch genügend löslich ist. Es sollte daher ein Präzipitin geschaffen werden, mit welchem es gelingt, auch völlig unlösliches Eiweiß, nachdem es durch chemische Eingriffe aufgelöst worden ist, zu differenzieren.

Blutserum, welches zunächst 30 Minuten lang einer Temperatur von 70° ausgesetzt, dann nach Zusatz von verdünnter Natronlauge 15—20 Minuten lang weiter erhitzt worden ist, so daß es nicht mehr mit Nativ- und Hitze-Präzipitin reagiert, erzeugt im Tierkörper ein „Hitze-Alkali“-Präzipitin, welches mit folgenden Eigenschaften diesen Zweck erfüllt:

Es reagiert sowohl mit der Injektionssubstanz, dem durch Hitze und Alkali denaturierten Serum, als auch mit Serum, welches nur erhitzt worden ist.

Es reagiert mit 3 Stunden lang gekochtem, völlig unlöslichem Serum, welches durch Erwärmen mit  $\frac{1}{10}$  normaler Natronlauge in Lösung gebracht (aufgeschlossen) worden ist. Da die Artspezifität durch die Alkalibehandlung keine Einbuße erleidet, stellt dieses Präzipitin ein sicheres Mittel dar — und zwar das bis jetzt einzige Mittel — zur Differenzierung von unlöslichem Eiweiß.

Es reagiert nicht mit nativem Serum, doch wird dieses reaktionsfähig, sobald es (auch in der Kälte) mit Natronlauge behandelt wird. Diese Aktivierung gegenüber Hitze-Alkali-Präzipitin erfolgt ungefähr mit derselben Geschwindigkeit, wie die gleichzeitig stattfindende Inaktivierung gegenüber Nativ-Präzipitin: sobald die Reaktionsfähigkeit des mit NaOH behandelten Serums mit Nativ-Präzipitin vollständig erloschen ist, reagiert es mit dem Hitze-Alkali-Präzipitin am kräftigsten.

Auf Grund der Eigenschaften der Injektionsflüssigkeit und des damit erzeugten Hitze-Alkali-Präzipitins erscheint die An-

nahme berechtigt, daß dieses aus zwei Präzipitinen besteht, von denen das eine vielleicht nur mit erhitztem, das andere mit durch NaOH verändertem Eiweiß reagiert und offenbar als Alkalialbuminat-Präzipitin anzusprechen ist. Doch reagiert das Präzipitin nur mit solchem Alkalialbuminat, welches durch einigermaßen vorsichtige Behandlung mit NaOH entstanden ist. Bei intensiverer Alkaliwirkung verliert das Eiweiß diese Eigenschaft und ist dann auch unfähig, im Tierkörper Präzipitin zu bilden.

Versuche, durch mäßige Behandlung von erhitztem Fleischsaft mit NaOH ein ähnliches Präzipitin für Muskeleiweiß darzustellen, haben bis jetzt zu keinem befriedigenden Resultat geführt. Doch wird das mit Serumeiweiß erzeugte Hitze-Alkali-Präzipitin in den meisten Fällen der Praxis auch für die Differenzierung von erhitzten Fleischprodukten ausreichen, da diese ja gewöhnlich genügend Bluteiweiß enthalten.

---

*Nachdruck verboten.*

[Aus der Veterinär-Abteilung des Kaiserlichen Gesundheitsamtes.]

### **Die Säureagglutination der Bakterien der Paratyphusgruppe.**

Von Dr. **Poppe**,  
wissenschaftlichem Hilfsarbeiter.

(Eingegangen bei der Redaktion am 6. Februar 1912.)

Leonor Michaelis hat festgestellt, daß viele Bakterienarten bei einem bestimmten, ihnen eigentümlichen Säuregrad agglutiniert werden. Als Maß der Säureagglutination dient daher die Angabe der Wasserstoff-Ionenkonzentration derjenigen Lösung, in der die betreffenden Bakterien ihr Agglutinationsoptimum haben. Mit Hilfe von sechs verschiedenen Säuregemischen ist es Michaelis nach seiner Methode gelungen, Typhus-, Paratyphus B-, Gärtner- und Tuberkelbacillen, Gono- und Meningokokken zu differenzieren, während *B. coli* durch Säure nicht und Choleravibrionen nur unvollständig agglutiniert wurden. Nach Michaelis liegt das

Optimum der Säureagglutinabilität des *B. typhi* bei einer Wasserstoff-Ionenkonzentration von  $4 \cdot 10^{-5}$ , des *B. paratyphi* B bei  $16 \cdot 10^{-5}$  bis  $32 \cdot 10^{-5}$ . *B. enteritidis* Gärtner hat je nach dem Stamme sein Agglutinationsoptimum zwischen  $3 \cdot 10^{-4}$  bis  $2,5 \cdot 10^{-3}$ , erweist sich jedoch durchaus nicht als einheitlich.

Rost, der die Angaben von Michaelis bestätigen konnte, hat berichtet, daß sich das Verfahren bei der bakteriologischen Diagnose des Typhus bewährt habe. Hinsichtlich der anderen Bakterien der Coli-Typhusgruppe kommt er jedoch zu dem Schluß, daß diese anscheinend ein wechselndes Agglutinationsoptimum haben. Um den Namen Säureagglutination zu vermeiden, der zur Verwechslung mit der spezifischen Serumagglutination führen könnte, schlägt Rost vor, für das Phänomen der Agglutination durch Säuren den Namen Säurefällung zu wählen.

Schließlich hat Schidowsky seine Erfahrungen mit dieser Methode in der medizinischen Sektion der schlesischen Gesellschaft für vaterländische Kultur in Breslau (Sitzung vom 17. November 1911) bekannt gegeben und eine Publikation hierüber in Aussicht gestellt.

Nach der Bekanntgabe der Michaelisschen Untersuchungen habe ich im Mai v. J. Versuche in der Richtung begonnen, ob sich diese Methode vielleicht zur weiteren Differenzierung der Bakterien der Paratyphusgruppe eignet. Ueber einen Teil meiner Versuche habe ich in der Oktober-sitzung der Berliner Vereinigung für experimentelle Biologie im Anschluß an eine Demonstration von Michaelis schon kurz berichtet.

Das Wesen dieser Reaktion besteht darin, daß amphotere Stoffe (Eiweiß, Bakterien) ein spezifisches Fällungsoptimum bei einer ganz bestimmten H-Ionenkonzentration haben. Lösungen von beliebiger, aber genau festgelegter  $[H^+]$ <sup>1)</sup> können hergestellt werden, indem man z. B. Lösungen von Natrium-Acetat mit geeigneten Mengen von Essigsäure versetzt. Für ein solches Essigsäure-Acetatgemisch berechnet sich die H-Konzentration nach der Gleichung  $[H^+] = K \cdot \frac{\text{Essigsäurekonzentration}}{\text{Acetatkonzentration}}$ , wobei K

1)  $[H^+]$  ist das Symbol für die Wasserstoff-Ionenkonzentration.



die elektrolytische Dissoziationskonstante der Essigsäure bedeutet, deren Wert mit Michaelis zu  $2 \cdot 10^{-5}$  gesetzt wird <sup>1)</sup>).

### Versuchsanordnung.

Bei den folgenden Versuchen wurde in Anlehnung an Michaelis nachstehendes Verfahren angewandt. Essigsäure-Acetatgemische wurden durch Vermengung gemessener Volumina von Normalnatronlauge und überschüssiger Normaleessigsäure hergestellt:

Lösung	nNaOH ccm	nCH <sub>3</sub> COOH ccm	dest. Wasser ccm	H-Ionenkonzentration (abgerundet)
I	5	7,5	87,5	$1 \cdot 10^{-6}$
II	5	10,0	85	$2 \cdot 10^{-6}$
III	5	15,0	80	$4 \cdot 10^{-6}$
IV	5	25,0	70	$8 \cdot 10^{-6}$
V	5	45,0	50	$16 \cdot 10^{-6}$
VI	5	85,0	10	$32 \cdot 10^{-6}$

Diese Säuremischungen sind lange Zeit haltbar und werden durch Zugabe eines Thymolkristalles vor Schimmelbildung geschützt.

Die in der letzten Spalte obiger Zusammenstellung angeführten H-Konzentrationen sind nach der angegebenen Gleichung berechnet. Allgemein berechnet sich die Anzahl Kubikzentimeter Essigsäure (x), die zur Herstellung einer bestimmten H-Konzentration erforderlich sind, bei konstanter Verwendung von 5 ccm nNaOH und einem Gesamtvolumen von 100 ccm nach der Gleichung

$$\begin{aligned}
 [\text{H}^+] &= \frac{K \cdot (x-5)}{5} \\
 &= \frac{2 \cdot 10^{-6} (x-5)}{5} \\
 x - 5 &= \frac{2,5 \cdot [\text{H}^+]}{10^{-6}} \\
 x &= \frac{2,5 \cdot [\text{H}^+]}{10^{-6}} + 5.
 \end{aligned}$$

1) Näheres über die physikalisch-chemischen Grundsätze für die Herstellung von bestimmten H-Konzentrationen findet sich in den Sammelwerken von

Michaelis, Methoden zur Herstellung bestimmter Wasserstoff-Ionenkonzentrationen in Abderhaldens Handbuch, Bd. 3, 1, p. 1339 ff.;

Neuberg, Der Harn sowie die übrigen Ausscheidungen und Körperflüssigkeiten von Mensch und Tier, Bd. 2, p. 1570 ff.

Außer diesen Säuregemischen braucht man zur Anstellung der Reaktion eine Bacillensuspension. Der Belag eines 24-stündigen oder älteren gutgewachsenen Schrägagarröhrchens wird vorsichtig ohne Verletzung des Nährbodens mit der Platinöse abgestrichen und in destilliertem Wasser aufgeschwemmt. Auch kann man die Bakterienaufschwemmung so herstellen, daß man nach Entfernung des Kondensationswassers 5 ccm destilliertes Wasser in das Agarröhrchen gibt und durch mäßiges Schütteln die Bakterien ablöst, die durch Zugabe von destilliertem Wasser auf die gewünschte Dichte gebracht werden. Auf die Dichte der Aufschwemmung kommt es nicht an, jedoch muß natürlich innerhalb derselben Reihe die gleiche Aufschwemmung benutzt werden. Auf ein Schrägagarröhrchen rechnet Michaelis 20—25 ccm destilliertes Wasser. Ich habe meine Versuche so angestellt, daß ich bei fast alleiniger Verwendung der Schüttelaufschwemmung, die meiner Meinung nach am einfachsten herzustellen ist, auf ein Schrägagarröhrchen 15 ccm destilliertes Wasser genommen habe. Die Aufschwemmung hat dann ungefähr die Dichte, wie sie für die Widalsche Reaktion gebraucht wird.

Zur Ausführung der Agglutination gibt man in eine Reihe von 6 Röhrchen gleiche Mengen Bacillenemulsion, z. B. 2 ccm, und fügt zu Röhrchen I 1 ccm der Lösung I, zu Röhrchen II 1 ccm der Lösung II usw. zu. Nach dem Durchschütteln kommen die Röhrchen für etwa 1 Stunde in den Brutschrank. Wenn in einem der Röhrchen eine Agglutination für das bloße Auge sichtbar wird, empfiehlt es sich, die Röhrchen aus dem Brutschrank herauszunehmen und bei Zimmertemperatur weiter zu beobachten.

#### Versuche mit Paratyphusbacillen.

Zur Untersuchung gelangten Paratyphus B-, Gärtner-, Suipestifer-, Mäusetyphus- und Psittakosebacillen, von denen die meisten in einer früheren Arbeit von mir hinsichtlich ihres biologischen und serologischen Verhaltens eingehend geprüft worden sind. Außerdem wurden einige Stämme von sogenannten Kälberruhrbakterien untersucht, die sich kulturell wie Paratyphus B verhalten, jedoch von Paratyphus B-Serum nur in geringem Grade agglutiniert werden (1:30). Auch

	I	II	III	IV	V	VI
<b>1. Paratyphus B-Bacillen</b>						
Clauß	—	—	—	—	++	++
Sambaß	—	—	+	++	++	++
Mathes	—	—	—	+	++	++
Müller	—	—	+	++	++	++
Frau Müller	—	—	—	—	++	++
Mirus	—	—	—	—	++	++
Saarbrücken	—	—	—	+	+	++
Institut	—	—	—	—	++	++
Infekt.	—	—	—	—	++	++
Günther	—	—	—	++	++	++
Frankenthal	—	—	+	++	++	++
Aertryck	—	—	—	+	++	+
Morbificans bovis	—	—	—	(+)	++	++
<b>2. Gärtnerbacillen</b>						
Jena	—	—	—	—	++	++
Yorkstraße	—	—	—	++	++	+
Ratin	—	—	+	++	++	++
Morrattin	—	—	+	++	++	++
<b>3. Suipestiferbacillen</b>						
1	—	—	—	+	±	—
7	—	—	—	++	++	++
H	—	—	—	+	—	—
W	—	—	—	+	—	—
O (neu)	—	—	—	+	++	++
Gans	—	—	—	++	++	++
<b>4. Psittakosebacillen</b>	—	—	—	(+)	++	++
<b>5. Mäusetyphusbacillen</b>	—	—	+	++	++	++
<b>Kälberruhrbacillen</b>						
6	—	—	+	++	++	—
27	—	—	+	+	++	++
79	—	—	+	+	++	++
88	—	—	+	++	++	++
Paracolibacillen	—	—	+	++	++	++
Voldagsen I	—	—	—	—	++	++
„ III	—	—	—	—	++	++
Glässer	—	—	—	—	++	++
Haendel und 664	—	—	+	++	++	++
Gildemeister 688	—	—	—	++	+	—
<b>Paratyphus A</b>	—	—	+	+	—	—
<b>Typhus (Milz)</b>	—	—	++	+	—	—
<b>„ (Lenharz)</b>	—	—	++	+	—	—
<b>Coli</b>	—	—	—	—	—	—

++ starke  
 + deutliche  
 ± undeutliche  
 (+) Sedimentbildung nach einigen Stunden bei Zimmertemperatur:  
 — homogene Trübung.

Agglutination nach 1 Stunde bei 37°;

einige andere inagglutinable Paratyphus B ähnliche Stämme, die ich der Liebesswürdigkeit des Herrn Regierungsrates Dr. Haendel und des Herrn Stabsarztes Dr. Gildemeister

verdanke, wurden geprüft (Stamm 664 und 688 — *B. suipestifer* Voldagsen und *B. typhi* suis Glässer, von denen letztere in ihrem kulturellen Verhalten dem *Typhusbacillus* nahestehen). Zum Vergleiche wurden schließlich noch *Paratyphus* A-, Typhus- und *Colibacillen* herangezogen.

Aus vorstehender Tabelle ist ersichtlich, daß das Optimum der Säureagglutinabilität für *Paratyphus* B-Bacillen in Röhrchen V bis VI liegt, was einer  $[H^+]$  von  $16 \cdot 10^{-5}$  bis  $32 \cdot 10^{-5}$  entspricht. Ganz einheitlich scheint das Fällungsoptimum jedoch nicht zu sein, da auch einige Stämme in Röhrchen IV noch stark ausgefällt wurden. Gärtner-, Psittakose- und Mäuse-typhusbacillen zeigen im allgemeinen das gleiche Fällungsoptimum wie *Paratyphus* B-Bacillen, im Gegensatz zu *Suipestifer*-bacillen, die sich teils wie *Paratyphus* B verhalten (7, Oneu, Gans), teils nur schwach durch Säure agglutiniert werden (1,  $H_2$ , W). Interessant ist es, daß die *Paratyphus* B ähnlichen Stämme (Kälberruhr, *Paracoli*, Voldagsen, Glässer, 664 und 688), die, wie erwähnt, durch *Paratyphus* B-Serum nicht beeinflußt werden, das gleiche Agglutinationsoptimum haben wie *Paratyphus* B-Bacillen. *Paratyphus* A- und Typhusbacillen haben ihr Agglutinationsoptimum in Röhrchen III, entsprechend einer  $[H^+]$  von  $4 \cdot 10^{-5}$ . *B. coli* wird durch Säure nicht beeinflußt.

Ferner ist hervorzuheben, daß spontan in Kochsalzlösung agglutinable Stämme (*Paratyphus* B Institut, *Suipestifer* 7, *Paracoli*) das gleiche Optimum zeigen, wie die diese Eigenschaft nicht zeigenden übrigen *Paratyphus*stämme. Da die Bakterien der *Paratyphus*gruppe besonders leicht die Fähigkeit erlangen, spontan zu agglutinieren (Poppe, Trautmann), so kommt der Säureagglutination zur Diagnostizierung derartiger Stämme eine gewisse Bedeutung zu.

Beiläufig ist noch zu erwähnen, daß auch mittels Formalin abgetötete Bacillenaufschwemmungen in destilliertem Wasser sich zur Aufstellung der Reaktion als geeignet erweisen.

#### Zusammenfassung.

Das von L. Michaelis angegebene Verfahren der Säureagglutination kann als Hilfsmittel zur Identifizierung der Bakterien der *Paratyphus*gruppe verwendet werden. Eine Unterscheidung der einzelnen Unterarten dieser Gruppe ist

jedoch auch mittels dieser Methode nicht möglich. Paratyphus B ähnliche Bakterien, die durch spezifisches Serum nicht beeinflußt werden, werden durch Säure in gleichem Grad agglutiniert wie Paratyphus B-Bacillen. Hieraus ergibt sich, daß die Säureagglutination der Paratyphusbakterien als Gruppenreaktion im weitesten Sinne anzusehen ist.

#### Literatur.

- Michaelis, Leonor, Deutsche med. Wochenschr., 1911, p. 969.  
Rost, Centralbl. f. Bakt., Abt. I, Orig., Bd. 60, 1911, p. 324.  
Schidowsky, Berliner klin. Wochenschr., 1912, p. 39.  
Poppe, Zeitschr. f. Infektionskrankh. der Haustiere usw., Bd. 5, 1908, p. 42.  
Haendel und Gildemeister, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 11, 1911, p. 304.  
Trautmann, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh., Bd. 45, 1903, p. 139.

#### Nachtrag während der Drucklegung.

Nach Abschluß meiner Untersuchungen veröffentlichte Beniasch in dieser Zeitschrift (Bd. 12, 1912, Heft 3) eine auf Veranlassung von Michaelis ausgeführte ausführliche Arbeit über die Säureagglutination der Bakterien. Beniasch ist es unter Verwendung von Säuregemischen mit anders abgestuften Wasserstoff-Ionenkonzentrationen gelungen, die Bakterien der Gärtner-Gruppe in zwei Untergruppen zu differenzieren, die mit den von Sobernheim und Seligmann mittels der Serumagglutination gefundenen zusammenfallen: 1. Untergruppe (Rattenbacillen)  $[H^+] = 1,4 \cdot 10^{-4}$ ; 2. Untergruppe (eigentliche Gärtnerbacillen)  $[H^+] = 2,2 \cdot 10^{-3}$ . In ähnlicher Weise ließen sich auch die Bakterien der Paratyphus B-Gruppe in zwei Untergruppen trennen. Im allgemeinen ergab sich jedoch, daß der Paratyphus B-Bacillus gegenüber der Säureagglutination sich durch eine bedeutend größere Beständigkeit auszeichnete als der Gärtnerbacillus. Bei meinen Untersuchungen mit Gärtnerbacillen, die nur vier derartige Stämme umfaßte, konnte ich eine Differenzierung in zwei Untergruppen nicht beobachten. Auch erwiesen sich die von mir geprüften menschlichen Paratyphus B-Stämme, die in ihrer Mehrzahl im Jahre 1905/06 aus Faeces von nicht tödlich verlaufenden Paratyphusfällen gezüchtet worden sind, in ihrer Säureagglutinabilität als vollkommen einheitlich.

*Nachdruck verboten.*

[Aus dem Institut für Hygiene und Bakteriologie der Universität  
Straßburg (Direktor: Geheimrat Prof. Dr. Uhlenhuth).]

**Ueber die Beziehung zwischen Komplementbindung und  
hämolysehemmender Wirkung von Serum normaler und  
infizierter Tiere <sup>1)</sup>.**

Von Dr. Aoki.

Mit 8 Kurven im Text.

(Eingegangen bei der Redaktion am 7. Februar 1912.)

In der Zeitschrift für Immunitätsforschung und experimentelle Therapie, 1911, Bd. 8, Heft 5/6, haben Müller, Gaetgens und ich über eine Beobachtung berichtet, welche darin besteht, daß inaktiviertes Serum von rotzkranken Pferden allein, ohne Antigen, eine im Verlauf der Erkrankung zunehmende Hemmung der Hämolyse im hämolytischen System ausübt, in der Weise, daß diese spontan hemmende Kraft des Serums — ausgedrückt durch die geringste Serummengung, welche ohne Antigen die Hämolyse noch spurweise hemmt — mit dem Bindungswert — der geringsten Serummengung, welche (bei Antigenzusatz) noch eine völlige Hemmung der Hämolyse bewirkt — auffallend parallel verläuft.

Es erschien nun wichtig, zu prüfen, ob dieses Phänomen bei mit anderen Bacillen infizierten Tieren ebenfalls vorkommt.

Wir bedienten uns bei diesen Versuchen derselben in unserer früheren Arbeit bereits mitgeteilten Methode, welche ich der Wichtigkeit halber hier nochmals kurz beschreiben möchte.

**Methode.**

Als hämolytisches System benützten wir: a) 1.0 cem einer 5-proz. Hammelblutkörperchen-Aufschwemmung, b) die doppelte Menge des Ambozeptortiters, welcher durch jedesmal frisch gewonnenes Komplement aus- titriert wurde, c) 0,03 cem Komplement.

Zur Prüfung der komplementbindenden Kraft der Sera wurden fallende Serummengen mit den unten näher bezeichneten Mengen Antigen und dem Komplement (0,3 cem einer 10-proz. Verdünnung) zusammengebracht;

1) Die vorliegenden Versuche wurden noch unter Leitung des verstorbenen Herrn Prof. Forster ausgeführt.

dazu wurde so viel physiologische Kochsalzlösung (0,85-proz.) zugefügt, daß das Ganze auf 3,0 ccm gebracht wurde. Diese Mischungen wurden 1 Stunde lang bei 37° gehalten, darauf wurde die doppelte Menge des hämolytischen Ambozeptortiters in 1 ccm Kochsalzlösung und 1,0 ccm einer 5-proz. Hammelblutkörperchen-Aufschwemmung zugesetzt. Nach 2-stündigem Aufenthalt bei 37° wurden die Proben herausgenommen und bis zum nächsten Tage im Eisschrank gelassen.

Zur Prüfung der spontan hämolysehemmenden Kraft der Sera wurde dasselbe Verfahren angewendet mit dem einzigen Unterschied, daß kein Antigen hinzugefügt wurde.

#### Versuche mit *Bacillus enteritidis* Gärtner.

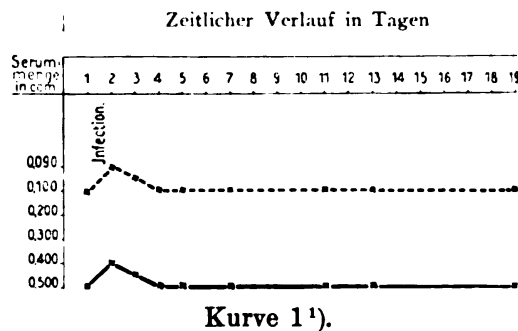
Das Antigen aus diesen Bacillen wurde wie folgt hergestellt.

Eine 24-stündige Schrägagarkultur wurde in 5 ccm NaCl aufgeschwemmt und bei 65° 30 Minuten lang erhitzt. Von dieser Aufschwemmung wurde 1,0 ccm mit 9 ccm Kochsalzlösung verdünnt. Davon wurde 0,5 ccm als einfache Antigendosis benutzt.

Von den infizierten Tieren wurden Blutproben zu verschiedenen Zeiten aus der Ohrvene steril genommen. Die so gewonnenen Sera wurden 30 Minuten lang bei 56° inaktiviert und im Frigo aufbewahrt. Die Aus-titrierung des Bindungswertes und der hämolysehemmenden Kraft der zu verschiedenen Zeiten entnommenen und im Frigo aufbewahrten Serumproben wurde dann nach der letzten Serumentnahme gleichzeitig vorgenommen, um unter möglichst gleichen Bedingungen, namentlich was den hämolytischen Ambozeptor und das Komplement anlangt, zu arbeiten. Selbstverständlich wurde bei jedem der folgenden Versuche auch vor der Infektion der Komplementbindungswert und die hämolysehemmende Kraft der Sera bestimmt.

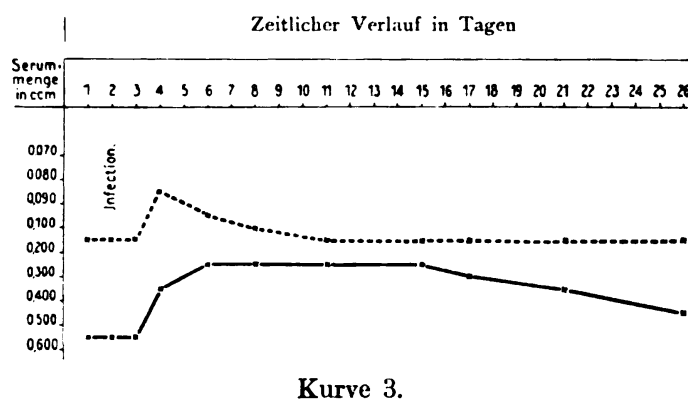
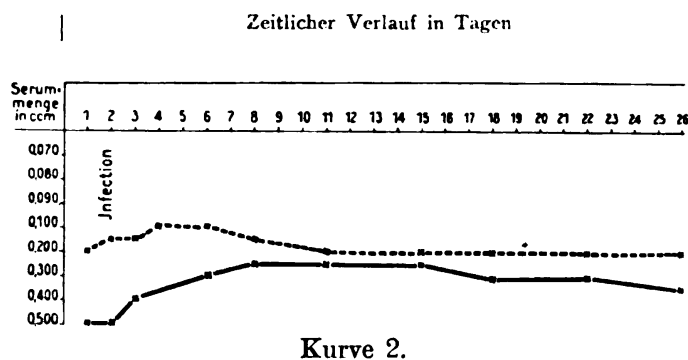
#### I. Versuch.

3 Kaninchen wurden mit *B. enteritidis* Gärtner infiziert. Bei einem Tiere wurde 0,5 ccm einer 24-stündigen Bouillonkultur subkutan eingespritzt. Es blieb ganz gesund. Bei den 8 Tage später entnommenen Blutproben haben weder der Bindungswert noch die hämolysehemmende Kraft des Serums eine Zunahme gezeigt. Sie verliefen ganz parallel, wie die Kurve 1 zeigt.



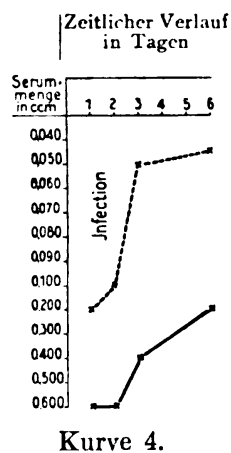
1) In sämtlichen Kurven bedeutet die punktierte Linie ( ) den Verlauf des Hämolyse-Hemmungstiters, die ausgezogene Linie ( ) den Verlauf des Komplement-Bindungstiters.

Die zwei anderen Tiere haben je eine halbe 24-stündige Schrägagarkultur derselben Mikroorganismen subkutan bekommen. Sie erkrankten ebenfalls nicht. Die in regelmäßigen Intervallen ausgeführten Prüfungen des Bindungswertes und der spontan hämolysehemmenden Kraft der Sera ergaben ebenfalls ein ziemlich paralleles Verhalten beider Werte, wie aus den Kurven 2 und 3 hervorgeht.



## II. Versuch.

2 ccm Bouillonkultur von *B. enteritidis* Gärtner wurden einem Kaninchen subkutan injiziert. Das Tier wurde am 3. Tage nach der Infektion deutlich krank. An der Impfstelle trat eine Abszeßbildung ein; vom 5. Tage an magerte das Tier stark ab. Es mußte aus anderen Gründen getötet werden.



Die Austitrierung von vier in verschiedenen Zeitintervallen entnommenen Serumproben ergab, daß der Bindungswert und die hämolysehemmende Kraft der Sera in deutlich parallel verlaufender Kurven zunahm (Kurve 4).

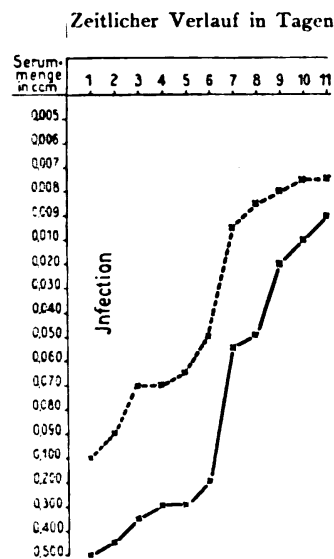


### III. Versuch.

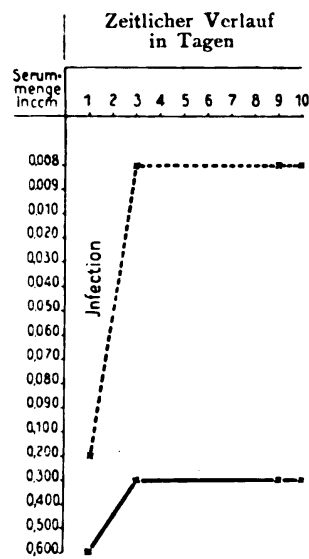
3 ccm einer 24-stündigen Bouillonkultur von *B. enteritidis* Gärtner wurden einem Kaninchen subkutan eingespritzt. Am 2. Tage nach der Infektion trat eine deutliche Abszeßbildung ein. Das Tier wurde krank. Es ging am 12. Tage ein.

Als das Resultat der Austitrierung der beiden Werte zeigte sich, daß, wie im vorhergehenden Versuche, beide Werte in parallel ansteigender Kurve zunahmen (Kurve 5).

Wir haben also auch hier das eingangs erwähnte auffällige Phänomen, welches wir zuerst bei rotzerkrankten Pferden feststellten.



Kurve 5.



Kurve 6.

### Versuche mit Pneumokokken.

Das Pneumokokkenantigen wurde so hergestellt, daß der Bodensatz von 50 ccm 24-stündiger Bouillonkultur in 10 ccm NaCl aufgeschwemmt wurde. 0,3 ccm von dieser Aufschwemmung diente jedesmal als einfache Antigendosis.

### IV. Versuch.

Einem Kaninchen wurde 0,1 ccm einer 24-stündigen Pneumokokkenbouillonkultur subkutan eingespritzt. Es ging nach 30 Stunden ein. Die Blutproben wurden vor der Infektion, 3 und 24 Stunden nach der Infektion und sofort nach dem Tode entnommen. Es wurden dann jedesmal der Bindungswert und der hämolysehemmende Titer festgestellt.

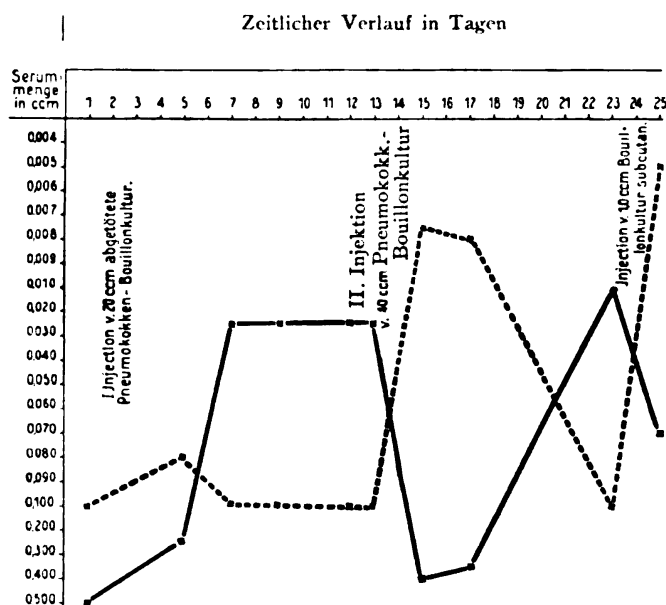
Es ergab sich, daß der Bindungswert niedrig blieb, während die hämolysehemmende Kraft zunahm (Kurve 6).

Wir immunisierten sodann ein Kaninchen mit abgetöteten Pneumokokken, um festzustellen, ob dasselbe Phänomen, welches wir bei mit Rotz immunisierten Tieren (Kaninchen) beobachteten, sich auch bei Kaninchen zeigt, welche mit Pneumokokken immunisiert werden. Dieses Phänomen besteht darin, daß der Bindungswert und die hämolysehemmende Kraft, welche gleich nach der Immunisierung zunehmen, nach einer gewissen Zeit auseinander gehen, in der Weise, daß der erstere immer weiter zunimmt, während der letztere zur Norm absinkt, so daß eine Kreuzung beider Kurvenlinien stattfindet<sup>1)</sup>.

#### V. Versuch.

Einem Kaninchen wurden 20 ccm durch Hitze abgetöteter Pneumokokkenkultur subkutan eingespritzt, nach 14 Tagen wurde eine zweite Injektion von 40 ccm abgetöteter Pneumokokkenbouillonkultur subkutan ausgeführt. Nach 23 Tagen erhielt das Tier 1,0 ccm lebende Pneumokokkenbouillonkultur subkutan. Am nächsten Tage ging es an Pneumokokken-Septikämie ein.

Wie die Kurve 7 zeigt, steigen hämolysehemmende Kraft und Bindungswert gleich nach der Injektion; dann fängt die



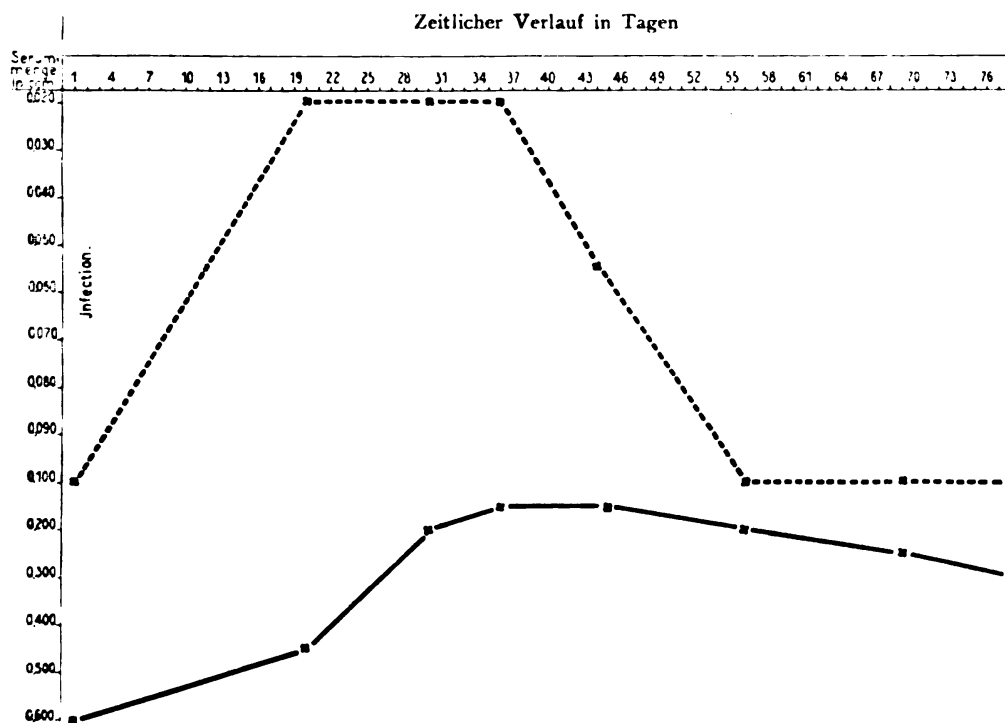
Kurve 7.

1) Siehe Zeitschr. f. Immunitätsf. etc., Bd. 8, Heft 5/6.

erstere an zu sinken und sinkt zur Norm, während die letztere immer noch weiter bis zum Maximum (am 7. Tage) zunimmt (1. Kreuzung). Diesen Zustand möchten wir das Immunitätsstadium nennen. Gleich nach der 2. Injektion nimmt die hämolysehemmende Kraft der Sera wieder zu, dagegen nimmt der Bindungswert stark ab (2. Kreuzung). Dieser Zustand der Reaktion dauert nicht lange, er geht bald wieder in den entgegengesetzten Zustand, den Immunitätszustand, über (3. Kreuzung). Durch die darauffolgende 3. Injektion mit lebenden Pneumokokken, welche tödlich verlief, wurde wieder ein anderer Zustand erzeugt, derselbe, den wir nach der 2. Injektion gesehen haben, nämlich Sinken des Bindungswertes und Steigen des Hämolysehemmungswertes. Danach haben wir hier denselben Befund, wie bei den mit Rotz immunisierten Tieren, über den wir früher berichtet haben.

#### Versuche mit Tuberkelbacillen.

Einem Kaninchen werden ca. 10 mg Tuberkelbacillen (Typ. hum.) subkutan injiziert, welche ich der Liebenswürdigkeit von Herrn Prof. Levy



Kurve 8.

verdanke. Das Tier bekam zunächst einen Abszeß an der Impfstelle, der nach einem Monat wieder ganz resorbiert war. Das Tier blieb ganz gesund. Die Blutproben wurden in verschiedenen Zeitintervallen entnommen und auf Bindungswert und hämolysehemmende Kraft geprüft.

Es ergab sich, daß beide Kurvenlinien bis zu einer gewissen Zeit zunahmen, worauf sie wieder allmählich abfielen (Kurve 8).

Wenn wir die obigen Resultate zusammenfassen, so haben wir folgende 4 Fälle vor uns.

1. Fall: Beide Kurvenlinien verlaufen, ohne wesentlich anzusteigen, parallel (Kurve 1, 2 und 3).

2. Fall: Beide Werte steigen in parallelem Verlaufe an (Kurve 4, 5 und 6).

3. Fall: Beide Werte nehmen zuerst zu, dann ab (Kurve 8).

4. Fall: Der Bindungswert steigt stetig, die hämolysehemmende Kraft dagegen fällt nach einer geringfügigen Steigerung wieder ab, so daß eine Kreuzung beider Kurven stattfindet (Kurve 7).

Die hämolysehemmende Kraft des Infektionsserums kann man sich wohl dadurch erklären, daß bakterielle Substanzen im Blut kreisen, welche bekanntlich nach den Arbeiten von Wilde, Ehrlich und Sachs<sup>1)</sup> die Hämolyse des hämolytischen Systems hindern.

Während der Infektion werden diese bakteriellen Substanzen allmählich immer neu gebildet und vermehrt; gleichzeitig werden aber auch komplementbindende Antikörper je nach der Reaktionsfähigkeit des Tieres in mehr oder minder steigenden Mengen gebildet. Infolgedessen steigen beide Kurvenlinien, wie besonders der oben genannte 2. Fall (Kurve 4, 5 und 6) zeigt. Bei der Immunisierung ist nun das Antigen, welches auf einmal in den Organismus eingeführt worden ist, eine gewisse Zeitlang noch im Serum vorhanden, wird aber allmählich abgebaut und verschwindet. Die Folge davon ist, daß die hämolysehemmende Kraft des Serums kurz nach der Injektion des Antigens zunimmt, bald aber wieder zur Norm sinkt. Die Antikörper werden dagegen immer noch weiter produziert und vermehrt. Während also

1) Kraus und Levaditi, Handbuch der Technik u. Methodik der Immunitätsf., Bd. 2, 1909, p. 1004.

die Kurve der Hämolysehemmung sinkt, steigt die der Komplementbindungskörper, so daß eine Kreuzung beider Kurvenlinien stattfindet, wie wir im 4. Fall sehen (Kurve 7).

Diese hier mitgeteilten interessanten Reaktionen des Organismus auf eingedrungene Infektionserreger sind nicht spezifisch, wie wir schon früher erwähnt haben; sie könnten aber vielleicht insofern eine praktische Bedeutung haben, als man aus der Bestimmung der hämolysehemmenden Kraft des Serums, kombiniert mit der Bestimmung des Komplementbindungstiters, einen orientierenden Rückschluß entweder auf den Grad der Erkrankung oder auf die Heilung bzw. den Grad der erreichten Immunität ziehen kann.

Wie wir oben bei den Tierversuchen und den mit Rotz infizierten Pferden beobachtet haben, ist die Zunahme der Komplementbindungskörper allein kein Faktor, aus dem man schließen dürfte, daß die Krankheit zur Heilung neigt. Vielmehr können trotz der Zunahme der Komplementbindungskörper die Bakterien sich vermehren, so daß das Tier unter Umständen zugrunde geht.

Ein weiteres genaueres Studium dieser Reaktionen bei verschiedenen Krankheiten wird vielleicht Gesetzmäßigkeiten erkennen lassen, welche sich diagnostisch und prognostisch verwerten lassen.

Zum Schluß danke ich Herrn Geheimrat Uhlenhuth und Herrn Privatdozent Dr. Dold bestens für die freundliche Durchsicht der Arbeit.

#### Zusammenfassung.

Es wird in der vorliegenden Arbeit gezeigt, daß die von Müller, Gaegtens und mir gemachte Beobachtung, daß inaktiviertes Serum von rotzkranken Pferden eine im Verlauf der Erkrankung zunehmende Hemmung der Hämolyse ausübt, auch für andere Infektionen (B. enteritidis Gärtner, Pneumokokken und Tuberkelbacillen) gilt. Bei der Infektion verläuft diese Hemmungsreaktion parallel mit der Komplementbindungsreaktion, während bei den Immunisierungsvorgängen beide Reaktionen zeitweise in entgegengesetztem Sinne verlaufen.

*Nachdruck verboten.*

[Aus dem Institut für Hygiene und Bakteriologie der Universität  
Straßburg (Direktor: Geheimrat Prof. Dr. Uhlenhuth).]

**Ueber die Bildung von Anaphylatoxin aus Streptokokken,  
Meningokokken, Gonokokken, B. mallei, B. pestis, B.  
pneumoniae Friedländer, B. Paratyphus B, Bacillen der  
Hühnercholera, des Schweinerotlaufs, Hefe Busse, Aktino-  
myces, Pilzsporen, Spirochäten der Hühnerspirillose und  
der russischen Recurrens.**

Von Privatdozent Dr. H. Dold und Dr. K. Aoki.

(Eingegangen bei der Redaktion am 10. Februar 1912.)

Die ersten Berichte Friedbergers und Goldschmids (1) über die Bildung des „Anaphylatoxins“ aus Bakterien betrafen Typhus- und Tuberkelbacillen, V. Metschnikoff und B. prodigiosus. Es folgten dann Mitteilungen von Neufeld und Dold (2) über Gewinnung des „Anaphylatoxins“ aus Pneumokokken und Cholerabacillen, und weitere Berichte von Friedberger (3) und seinen Mitarbeitern Goldschmid, Jerusalem, Szymanowski, Reiter, Schütze über gelungene Giftbildung aus Staphylokokken, Diphtheriebacillen, Dysenteriebacillen, Aspergillus fumigatus, Trypanosomen. Neuerdings haben A. Schütze (4) über die Darstellung des Giftes aus B. anthracis und Izar (5) aus dem Micrococcus melitensis, Moro und Tomono (6) aus B. pseudodysenteriae A und Vay (7) aus Pestbacillen berichtet. Die Leichtigkeit, mit der sich das Gift aus den verschiedenen Bakterienarten abspalten ließ, variierte sehr; aber es ließ sich doch das Gift aus all den genannten Bakterien nach den Angaben der Autoren gewinnen.

Die erste Bakterienart, welche sich bezüglich der Anaphylatoxinbildung anscheinend gänzlich refraktär verhielt, war nach den Untersuchungen von P. Th. Müller (8) der Streptococcus. Es gelang dem genannten Autor, trotz mannigfacher Variierung der Versuchsanordnung, weder aus lebenden noch aus gekochten Streptokokken, weder mit noch ohne Immun-

serum und auch nicht mit dem Serum vorbehandelter Tiere Anaphylatoxin abzuspalten. Auch die Erzeugung einer aktiven und passiven Anaphylaxie bei Meerschweinchen gegen Streptokokken erwies sich ganz abnorm schwierig, ja fast unmöglich, so daß P. Th. Müller dem Streptococcus eine Sonderstellung gegenüber anderen Bakterienarten bezüglich der Fähigkeit, Anaphylaxie und Anaphylatoxin zu erzeugen, zuerkennt.

In demselben Sinne spricht sich Aronson (9) aus, dem es in zahlreichen Versuchen niemals gelang, aus Streptokokken (weder aus lebenden noch aus gekochten) ein akut wirkendes Toxin zu gewinnen.

Die Streptokokken hat Aronson in Bouillonkolben kultiviert, wobei nur die sich absetzende Masse der Streptokokken nach Abguß der überstehenden Bouillon zu den Versuchen benutzt wurde. Dieser Bodensatz wurde mit Kochsalzlösung gewaschen und hernach im Vakuum getrocknet. Abgewogene Bakterienmengen wurden dann in 1 ccm Kochsalzlösung aufgeschwemmt und mit 4—4,5 ccm frischem Meerschweinchenkomplement versetzt. Nach 2-stündigem Aufenthalt im Brutschrank, wurden die durch Zentrifugieren von den Bakterien befreiten Abgüsse 190—210 g schweren Meerschweinchen intravenös injiziert.

#### **Eigene Versuche mit Streptokokken.**

Wir haben ebenfalls Versuche mit Streptokokken angestellt, und zwar mit verschiedenen Stämmen: a) 1 Stamm Gr. Lichterfelde, b), c) und d) 3 Stämmen, die wir der Liebenswürdigkeit des Herrn Dr. Hamm, Assistenzarzt an der Universitäts-Frauenklinik, verdanken. Diese 3 Stämme waren sämtlich aus Streptokokkenseptikämien von Wöchnerinnen herausgezüchtet und hatten die Eigenschaft, zu hämolysieren.

Wir geben im folgenden die Versuche wieder, über deren wesentlichste Ergebnisse der eine von uns (Dold) bereits im November 1911 im Straßburger med.-naturw. Verein (10), sowie in seiner Monographie (11) über das Bakterienanaphylatoxin kurz berichtet hat.

In auffallendem Gegensatz zu den völlig negativen Ergebnissen, zu denen P. Th. Müller und Aronson gelangten, erhielten wir bei unseren 18 Versuchen mit Streptokokken 7mal ein akut unter Krämpfen tötendes Gift, und 2mal eine zwar Krämpfe, aber keinen Tod erzeugende Giftdosis.

Wir gewannen die Streptokokken, indem wir sie in 50 ccm Bouillon haltigen Erlenmeyerkölbchen kultivierten und dann aus den 1–14 Tage alten Kulturen die Streptokokken auszentrifugierten. Die Bodensätze wurden nach Abguß der überstehenden Bouillon und Waschung mit physiologischer Kochsalzlösung stets mit 4 ccm frischem sterilen Meerschweinchen-Mischkomplement versetzt und stets vier Stunden lang bei 37° bebrütet. Hierauf wurden die Bakterien durch Zentrifugieren wieder entfernt und der klare Abguß Meerschweinchen von ca. 200 g Gewicht intravenös injiziert.

Tabelle I.  
Streptokokken.

No.	Streptokokken	Bebrütet		In- jizierte Menge	Gewicht des in- jizierten Meerschw.	Wirkung
		mit Kom- plement	Zeit			
1	Stamm Gr. Lichterfelde 2-täg. Bouillonkultur 30 ccm <sup>1)</sup>	4 ccm	4 <sup>h</sup> 37°	4 ccm	200	0
2	dgl. 50 ccm	4 „	dgl.	4 „	200	+ 3'
3	„ 50 „	4 „	„	4 „	210	0
4	„ 50 „	4 „	„	4 „	200	0
5	„ 50 „	4 „	„	4 „	190	0
6	Stamm Hamm I 24-stündige Bouillonkultur 50 ccm	4 „	„	4 „	220	+ 2'
7	dgl. 25 ccm	4 „	„	4 „	200	0
8	„ 12 „	4 „	„	4 „	210	0
9	„ 5 „	4 „	„	4 „	210	0
10	Stamm Hamm II 24-stündige Bouillonkultur 20 ccm	4 „	„	4 „	200	Krämpfe, erholtsich
11	dgl. 10 ccm	4 „	„	4 „	220	0
12	„ 5 „	4 „	„	4 „	200	+ 2'
13	Stamm Hamm III 12-tägige Bouillonkultur 25 ccm	4 „	„	4 „	190	+ 3'
14	dgl. 10 ccm	4 „	„	4 „	220	Krämpfe
15	„ 5 „	4 „	„	4 „	210	+ 3'
16	Stamm Hamm III 14-tägige Bouillonkultur 25 ccm	4 „	„	4 „	200	0
17	dgl. 10 ccm	4 „	„	4 „	190	+ 4'
18	„ 5 „	4 „	„	4 „	210	+ 3'

Wie erklären sich nun diese differierenden Versuchsergebnisse? Zunächst müssen auch wir zugeben, daß wir bei unseren 9 ersten Versuchen (mit dem Stamm Gr. Lichterfelde und Stamm Hamm I) ebenfalls die Erfahrung machten, daß die Abspaltung des Giftes aus Streptokokken bedeutend schwerer als aus anderen Bakterien, z. B. den Pneumokokken erfolgt. Aber wir sahen doch

1) D. h. der aus 30 ccm usw. auszentrifugierte Bodensatz.



immerhin unter 9 Versuchen 2mal das Auftreten eines akut unter Krämpfen tötenden Giftes, und in den folgenden Versuchen erhielten wir, wie aus der Tabelle ersichtlich, das „Anaphylatoxin“ sogar mit einer gewissen Regelmäßigkeit.

Vergleicht man unsere Versuchsanordnung mit der von Aronson, so ist zunächst zu bemerken, daß, während Aronson gewaschene und im Vakuum getrocknete Streptokokkenmassen verwendete, wir die ausgeschleuderten, frischen, gewaschenen Streptokokken mit dem Komplement zusammen brachten. In den Versuchen von Aronson wurden die Streptokokken nur zwei Stunden, bei unseren Versuchen dagegen vier Stunden lang bebrütet. Dies könnte den Unterschied unserer Versuchsergebnisse zum Teil bedingen, um so mehr als Aronson selbst in einer Randbemerkung mitteilt, daß er neuerdings bei Anwendung von 0,1 g trockener Streptokokken und vier Stunden langer Bebrütung mit 5 ccm Komplement ein unter Temperatursturz in 5 Stunden tötendes Toxin erhalten hat.

Die Versuche von Aronson würden also zeigen, daß eine 2-stündige Bebrütung der getrockneten Streptokokken mit Komplement nicht genügt, um eine akut tödliche Giftosis entstehen zu lassen und daß bei dem getrockneten Streptokokkenmaterial auch durch eine 4-stündige Bebrütung noch nicht genügend fertiges „Anaphylatoxin“ gebildet wurde, sondern nur eine genügende Streptokokkenextraktmenge, welche das Tier innerhalb 5 Stunden tötete (indem wahrscheinlich das Komplement des injizierten Tieres dieses gelöste Streptokokkeneiweiß zu Anaphylatoxin abbaute). Auf die Frage der Bakterienextrakte und ihre Beziehung zum „Anaphylatoxin“ soll hier nicht näher eingegangen werden.

Die differierenden Versuchsergebnisse könnten sich weiterhin noch dadurch erklären, daß mit verschiedenen Streptokokkenstämmen gearbeitet wurde und daß sich die verschiedenen Stämme bezüglich ihrer Fähigkeit zur Anaphylatoxinbildung verschieden verhalten. Auch wir erhielten mit dem Stamm Groß Lichterfelde und dem Stamm Hamm I seltener positive Resultate wie mit den Stämmen Hamm II und III.

Die Stämme Groß Lichterfelde und Hamm I zeigten nur geringe, die Stämme Hamm II und III dagegen starke hämo-

lytische Wirkung. Möglicherweise eignen sich die stark hämolysierenden Stämme besser zur Abspaltung des Giftes.

Auch haben wir den Eindruck gewonnen, daß zur Gewinnung genügender Giftmengen bei den Streptokokken relativ größere Mengen nötig sind als bei anderen Bakterien, und daß eine Giftspaltung im allgemeinen leichter gelingt, bei älteren Kulturen (10—14 Tage alten) wie bei jüngeren, wobei allerdings berücksichtigt werden muß, daß eine ältere Bouillonkultur nicht bloß ältere, sondern auch mehr Streptokokken enthält wie eine junge Kultur.

#### Versuche mit Pilzsporen.

Versuche mit Schimmelpilzen sind von Friedberger und seinen Mitarbeitern Goldschmid und Szymanowski mit positivem Ergebnis angestellt worden. Wir haben ebenfalls solche Versuche unternommen und deren Resultate in der folgenden Tabelle II zusammengestellt. Zu bemerken ist, daß wir bei den in der Tabelle zusammengestellten Versuchen nur die Sporen, nicht das Mycel der Pilze, verwendeten.

Tabelle II.

*Aspergillus fumigatus* und *Penicillium glaucum*.

No.	Pilzsporen			Bebrütet		Inji- zierte Menge	Gewicht der inji- zierten Meerschw.	Wir- kung
				mit Kom- plement	Zeit			
1	<i>Asperg. fumigatus</i>	3 Oesen	4 ccm	4 "	37°	4 ccm	200	0
2	"	5 "	4 "	4 "	dgl.	4 "	220	0
3	"	4 "	4 "	4 "	"	4 "	210	0
4	"	8 "	4 "	4 "	"	4 "	190	0
5	"	16 "	4 "	4 "	"	4 "	180	0
6	"	1 Oese	4 "	4 "	"	4 "	200	0
7	<i>Penicillium glaucum</i>	2 Oesen	4 "	4 "	"	4 "	200	0
8	"	4 "	4 "	4 "	"	4 "	210	0

Wie aus der obenstehenden Tabelle hervorgeht, erhielten wir weder aus Sporen der *Aspergillus fumigatus* noch des *Penicillium glaucum* ein „Anaphylatoxin“. Die Technik war dieselbe wie bei den früheren Anaphylatoxin-

versuchen. Die Sporen wurden mit einer Platinöse dem Schimmelrasen entnommen und direkt in das frische Meerschweinchenkomplement gebracht. Bebrütung und Injektion geschah wie bei den früheren Versuchen.

In dem Versuche von Friedberger und Goldschmid (12) wurde „eine kleine Masse *Aspergillus fumigatus* von feuchtem Brot“ mit 4,0 normalem Meerschweinchenserum versetzt. Die Differenz der Versuchsergebnisse erklärt sich wohl zwanglos damit, daß wir nur Pilzsporen auf ihre Fähigkeit zur Anaphylatoxinbildung prüften, während die genannten Autoren auch das Pilzmycel bei ihren Versuchen mitverwendeten.

Wir haben im folgenden eine Reihe weiterer wichtiger pathogener Bakterienarten auf ihre Fähigkeit, Anaphylatoxin zu bilden, untersucht, nämlich den *B. mallei*, *B. pestis*, den *Meningococcus*, den *Gonococcus*, den *B. paratyphi* B, den *B. pneumoniae* Friedländer, den *B. der Hühnercholera*, des Schweinerotlaufs, den *Aktinomyces* und die Hefe *Busse*.

Die Technik war immer dieselbe wie bei den früheren Versuchen, so daß sich eine nochmalige Beschreibung derselben erübrigt.

#### Versuche mit Paratyphus-B-Bacillen.

Da der Paratyphus-B-Bacillus sich in mancher Beziehung anders verhält als der Typhusbacillus, dessen Fähigkeit zur Anaphylatoxinbildung ja bekannt ist, hielten wir es für angebracht, auch den Paratyphus B auf seine Fähigkeit zur Bildung des Giftes zu untersuchen.

Tabelle III.  
Paratyphus-B-Bacillen.

No.	Bakterienmenge	Bebrütet		Injizierte Menge	Gewicht der injizierten Meerschw.	Wirkung
		mit Komplement	Zeit			
1	4 Oesen	4 ccm	4 <sup>h</sup> 37°	4 ccm	200	+ 2'
2	6 „	4 „	dgl.	4 „	190	+ 3'
3	12 „	4 „	„	4 „	210	+ 2'
4	4 „	4 „	„	4 „	200	+ 3'

Wie aus der Tabelle III ersichtlich ist, gelingt es mit Leichtigkeit und großer Regelmäßigkeit, ein akut wirkendes Gift aus den Paratyphus-B-Bacillen abzuspalten. Wir haben auch bei Gelegenheit anderer Versuche uns überzeugen können, wie leicht und regelmäßig die Darstellung des Anaphylatoxins aus Paratyphus-B-Bacillen gelingt.

#### Versuche mit Rotz.

Wir zogen des weiteren auch die Rotzbacillen in den Bereich unserer Untersuchungen. Wie aus der Tabelle III hervorgeht, gelingt es auch aus dem *B. mallei* mit Leichtigkeit und Regelmäßigkeit Anaphylatoxin abzuspalten. Besonders bemerkenswert ist Versuch 2 und 3, welcher zeigte, daß man selbst aus 6, ja 12 Monate alten Sammlungskulturen noch das Gift gewinnen kann.

Tabelle IV.

*B. mallei*.

No.	Bakterienmenge	Bebrütet		Inji- zierte Menge	Gewicht der inji- zierten Meerschw.	Wir- kung
		mit Kom- plement	Zeit			
1	6 Oesen	4 ccm	4 <sup>a</sup> 37°	4 ccm	200	+ 3'
2	1 Schrägagarkult. (6 Mon. alt)	4 "	dgl.	4 "	210	+ 3'
3	1 " (12 " " "	4 "	"	4 "	210	+ 3'
4	3 Oesen	4 "	"	4 "	190	+ 4'
5	1 Oese	4 "	"	4 "	180	+ 3'

#### Versuche mit *B. pestis*.

Durch die Liebenswürdigkeit von Herrn Dr. Rothermundt sind wir in den Besitz von abgetöteten Pestbacillen aus dem Berner Institut (Prof. Kolle) gelangt. Die Bacillen wurden uns in Form einer Aufschwemmung übersandt. Leider konnten wir nicht in Erfahrung bringen, wie stark die Aufschwemmung war. Nach dem Aussehen der 5 ccm betragenden Suspensionsflüssigkeit vermuten wir aber, daß es sich um eine Aufschwemmung einer Schrägagarkultur in 5 ccm Kochsalzlösung handelte. Da wir nicht quantitative Fragen zu lösen hatten, vielmehr nur feststellen wollten, ob eine Ana-

phylatoxinbildung aus Pestbacillen erfolgt oder nicht, war die Stärke der Aufschwemmung für uns ziemlich belanglos. Die in der Tabelle V niedergelegten Versuche, die mit fallenden Mengen dieser Aufschwemmung angestellt wurden, beweisen jedenfalls, daß die Abspaltung des Giftes aus Pestbacillen offenbar leicht und regelmäßig erfolgt.

Vay (7) ist es in seinen Versuchen mit frischen und getrockneten Pestbacillen nicht so regelmäßig wie uns gelungen, ein akut tötendes Gift aus Pestbacillen zu gewinnen. Unter 7 Versuchen gelang es ihm nur zweimal eine Krämpfe erzeugende und nur einmal eine akut tötende Giftdosis zu erhalten.

Tabelle V.  
B. pestis (abgetötet).

Nr.	Bakterienmenge	Bebrütet		Injizierte Menge	Gewicht der injizierten Meersch.	Wirkung
		mit Komplement	Zeit			
1	2,5 ccm einer Aufschwemmung von Pestbacillen	2,5 ccm	4 <sup>h</sup> 37°	4 ccm	200	+ 2'
2	1,0 „ dgl.	3,0 „	dgl.	4 „	200	+ 2'
3	0,5 „ „	3,5 „	„	4 „	180	+ 3'

#### Versuche mit Meningokokken.

Die folgenden Versuche wurden mit Meningokokken hergestellt. Bei 3 Versuchen gelang es nur einmal, ein akut tötendes Gift abzuspalten. Immerhin — es gelang, und die Feststellung der Tatsache als solcher bildete den Hauptzweck unserer Versuche.

Tabelle VI.  
Meningokokken.

Nr.	Bakterienmenge	Bebrütet		Injizierte Menge	Gewicht der injizierten Meersch.	Wirkung
		mit Komplement	Zeit			
1	6 Oesen	4 ccm	4 <sup>h</sup> 37°	4 ccm	200	0
2	4 „	4 „	dgl.	4 „	200	+ 3'
3	2 „	4 „	„	4 „	210	0

**Versuche mit Gonokokken.**

Die zu diesen Versuchen verwendeten Gonokokken waren uns in liebenswürdiger Weise von dem Králschen Laboratorium in Wien zur Verfügung gestellt worden. Wie aus der Tabelle VII ersichtlich, gelingt es bei den Gonokokken offenbar leichter und regelmäßiger als bei den ihnen in mancher Beziehung so verwandten Meningokokken, eine genügende Anaphylatoxindosis zu erhalten. In 3 Versuchen mit Gonokokken gelang es dreimal, ein akut tötendes Gift zu gewinnen.

Tabelle VII.  
Gonokokken.

No.	Bakterien- menge	Bebrütet		Injizierte Menge	Gewicht der injizierten Meerschw.	Wirkung
		mit Kom- plement	Zeit			
1	5 Oesen	4 ccm	4 <sup>h</sup> 37°	4 ccm	200	† 2'
2	4 "	4 "	dgl.	4 "	190	† 3'
2	2 "	4 "	"	4 "	200	† 3'

**Versuche mit B. pneumoniae Friedländer.**

Zu den Bakterien, welche mit fast absoluter Regelmäßigkeit beim Zusammenbringen mit frischem Meerschweinchen-serum ein akut tötendes Gift entstehen lassen, gehört der B. pneumoniae Friedländer, wie aus der folgenden Tabelle VIII hervorgeht, wo alle 4 Versuche positiv ausfielen.

Wir haben uns auch bei Gelegenheit anderer Versuche, die nicht in die Tabelle aufgenommen sind, wiederholt davon überzeugen können, wie sicher die Abspaltung des Giftes aus dem B. pneumoniae Friedländer gelingt.

Tabelle VIII.  
B. pneumoniae Friedländer.

No.	Bakterien- menge	Bebrütet		Injizierte Menge	Gewicht der injizierten Meerschw.	Wirkung
		mit Kom- plement	Zeit			
1	6 Oesen	4 ccm	4 <sup>h</sup> 37°	4 ccm	210	† 2'
2	4 "	4 "	dgl.	4 "	200	† 4'
3	2 "	4 "	"	4 "	200	† 3'
4	3 "	4 "	"	4 "	200	† 3'

**Versuche mit dem Bacillus der Hühnercholera.**

Wir untersuchten nun weiterhin auch einige Erreger von Tierseptikämien, und zwar zuerst die Bacillen der Hühnercholera. Auch bei ihnen gelingt es mit ziemlicher Regelmäßigkeit, eine genügende Anaphylatoxindosis abzuspalten, wie aus Tabelle IX hervorgeht, wo unter 4 Versuchen 3 positiv ausfielen.

Tabelle IX.  
B. der Hühnercholera.

No.	Bakterienmenge	Bebrütet		Injizierte Menge	Gewicht der injizierten Meersch.	Wirkung
		mit Komplement	Zeit			
1	3 Oesen	4 ccm	4 <sup>h</sup> 37°	4 ccm	200	+ 3'
2	4 „	4 „	dgl.	4 „	190	+ 4'
3	4 „	4 „	„	4 „	210	+ 2'
4	2 „	4 „	„	4 „	200	0

**Versuche mit Schweinerotlaufbacillen.**

Wie die Hühnercholera-bacillen, so zeigten sich auch die Bacillen des Schweinerotlaufs in unseren Versuchen sehr geeignet zur Anaphylatoxingewinnung. Von den in Tabelle X wiedergegebenen Versuchen fielen sämtliche positiv aus.

Tabelle X.  
Schweinerotlaufbacillen.

No.	Bakterienmenge	Bebrütet		Injizierte Menge	Gewicht der infizierten Meersch.	Wirkung
		mit Komplement	Zeit			
1	4 Oesen	4 ccm	4 <sup>h</sup> 37°	4 ccm	180	+ 3'
2	4 „	4 „	dgl.	4 „	200	+ 3'
3	2 „	4 „	„	4 „	210	+ 5'
4	5 „	4 „	„	4 „	200	+ 4'

**Versuche mit Hefezellen.**

Wir legten uns weiterhin die Frage vor, ob es möglich ist, auch aus Hefezellen das Anaphylatoxin abzuspalten

und benützten für diese Versuche die Hefe Busse, die sich ja leicht auf gewöhnlichem Schrägagar kultivieren läßt. Wie die Tabelle XI zeigt, gelingt es in der Tat, auch aus Hefezellen durch Zusammenmischen mit frischem Meerschweinchenserum ein akut tötendes Gift abzuspalten.

Tabelle XI.

## Hefe Busse.

No.	Bakterienmenge	Bebrütet		Injizierte Menge	Gewicht der injizierten Meerschw.	Wirkung
		mit Komplement	Zeit			
1	12 Oesen	4 ccm	4 <sup>h</sup> 37°	4 ccm	200	† 4'
2	6 „	4 „	dgl.	4 „	200	0

## Versuche mit Aktinomyces.

Schließlich haben wir noch Versuche mit *Actinomyces bovis* angestellt. *Actinomyces*kolonien wurden von einer Schrägagarkultur abgehoben, im Mörser zerrieben und mit etwas physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt. Das so gewonnene Material wurde mit frischem Meerschweinchenserum gemischt und in der üblichen Weise bebrütet. Unter zwei Versuchen gelang es einmal, das typisch wirkende Anaphylatoxin zu erhalten, wie aus der Tabelle XII hervorgeht.

Tabelle XII.

## Aktinomyces.

No.	Bakterien	Bebrütet		Injizierte Menge	Gewicht der injiz. Meerschw.	Wirkung
		mit Komplement	Zeit			
1	Im Mörser zerriebenes <i>Aktinomyces</i> material dgl.	4 ccm	4 <sup>h</sup> 37°	4 ccm	190	† 4'
2		4 „	dgl.	4 „	200	0



### Zusammenfassung.

Ueberblickt man die Ergebnisse unserer Versuche<sup>1)</sup>, so springt vor allem die durchgehende Regelmäßigkeit in die Augen, mit der die von uns untersuchten verschiedenen Bakterienarten das Anaphylatoxin lieferten. Nimmt man die Ergebnisse früherer Untersuchungen hinzu, so ist man wohl berechtigt zu sagen, daß die von Friedberger zuerst bei Typhusbacillen und einigen anderen Bakterien gemachte Entdeckung des „Bakterienanaphylatoxins“ in der Tat die von ihm vermutete allgemeine Giltigkeit und Bedeutung für die Bakterien überhaupt hat.

Die Unterschiede, welche zwischen den einzelnen Bakterien bezüglich der Leichtigkeit, mit der sie das Gift bilden, vorhanden sind, sowie die noch bestehenden Differenzen in den Versuchsergebnissen einzelner Autoren treten hinter dieser wichtigen Tatsache zurück.

Entgegen den Erfahrungen von P. Th. Müller und Aronson fanden wir, daß die Streptokokken keine Ausnahme von der Regel bilden, indem bei ihnen die Bildung des Giftes zwar im allgemeinen schwerer als beim Durchschnitt der Bakterien gelingt, aber doch immerhin gelingt (in unseren Versuchen in ca. 50 Proz. der Fälle).

Die möglichen Ursachen der Differenz der Versuchsergebnisse von P. Th. Müller und Aronson einerseits und uns andererseits haben wir oben diskutiert.

Die einzigen Mikroorganismen, bei denen uns eine Giftgewinnung bei Anwendung der üblichen Methode bis jetzt nicht gelang, waren die Pilze, und zwar die Pilzsporen von *Penicillium glaucum* und *Aspergillus fumigatus*.

Aus allen anderen Mikroorganismen, die wir untersuchten (Streptokokken, Paratyphus B, Meningokokken, Gonokokken, *B. pestis*, *B. pneumo-*

---

1) Anmerkung bei der Korrektur: In neueren Versuchen gelang es uns, auch aus den Spirochäten der Hühnerspirillose und der russischen *Recurrentis* das „Anaphylatoxin“ abzuspalten.

niae Friedländer, *B. mallei*, *B. der Hühnercholera*, *B. des Schweinerotlaufs*, Hefe Busse, *Aktinomyces*, *Spirochäten der Hühnerspirillose* und der russischen *Recurrans*) erhielten wir mit mehr oder weniger großer Regelmäßigkeit das Gift.

#### Literatur.

- 1) Friedberger, Berl. klin. Wochenschr., 1910.  
— Zeitschr. f. Immunitätsforsch. etc., Bd. 7 ff.
- 2) Neufeld und Dold, Berl. klin. Wochenschr., 1911.
- 3) Friedberger, Goldschmid, Szymanowski, Schütze, Nathan, Reiter, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. etc., 1911, Bd. 9, Bd. 10, Bd. 11.
- 4) Schütze, A., Berl. klin. Wochenschr., 1911.
- 5) Izar, G., Zeitschr. f. Immunitätsforsch., 1911, Bd. 11, H. 5.
- 6) Moro und Tomono, Zeitschr. f. Immunitätsforsch., 1911, Bd. 9, H. 5.
- 7) Vay, F., Zeitschr. f. Immunitätsforsch. etc., 1911, Bd. 11, H. 3/4.
- 8) Müller, P. Th., Zeitschr. f. Immunitätsforsch., 1911, Bd. 10 u. 11.
- 9) Aronson, Berl. klin. Wochenschr., 1912, No. 5 u. 6.
- 10) Dold, Med.-naturwiss. Verein in Straßburg, Nov.-Sitzung 1911.
- 11) — Das Bakterienanaphylatoxin und seine Bedeutung für die Infektion. Jena, G. Fischer, 1912.
- 12) Friedberger und Goldschmid, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. etc., 1911, Bd. 9, p. 412.

*Nachdruck verboten.*

[Aus der Medizinischen Klinik zu Heidelberg.]

**Bemerkung zu der Arbeit von Mc Intosh, Fildes and Dearden: Salt fever and the treatment of Syphilis by "606"**  
(Bd. 12 dieser Zeitschrift).

Von Dr. **H. Freund**, Assistenten der Klinik.

Mit 1 Kurve im Text.

(Eingegangen bei der Redaktion am 4. April 1912.)

In Bd. 12 dieser Zeitschrift haben Mc Intosh, Fildes und Dearden eine Arbeit veröffentlicht: Salt fever and the treatment of Syphilis by "606". Auf Grund ihrer Beobachtungen (am Menschen) kommen sie dabei zu folgendem Schlußsatz: „Kochsalzfeber verdankt seine Entstehung dem Vorhandensein der in der angewandten Lösung vorkommenden Bakterien.“

Gegen die Richtigkeit dieses Satzes, der eine Ablehnung aller bisherigen Arbeiten über das Kochsalzfeber enthält, habe ich dreierlei Beobachtungen anzuführen:

1) In der von den Verfassern zitierten Arbeit<sup>1)</sup> habe ich eine größere Zahl von Versuchen angeführt, in denen ich die „Entgiftung“ meiner Kochsalzlösungen zeigen konnte (so z. B. 18 eindeutige Versuche mit Ringer). Ich bin mit den Verfassern der Ansicht, daß die gelegentlich beschriebenen Fälle von Fieber durch Ringersche Flüssigkeit<sup>2)</sup> auf einer Bakterienbeimengung beruhen. Das hat aber mit dem Kochsalzfeber und seiner Entgiftung nichts zu tun. Im übrigen geht auch schon aus den ganz regelmäßigen, sehr hohen Temperatursteigerungen, welche die Verfasser in gleicher Weise nach

---

1) H. Freund, Kochsalzfeber. Arch. f. exp. Path. u. Pharmak., Bd. 65, 1911.

2) H. Freund und E. Grafe, Stoffwechseluntersuchungen beim experimentellen Kochsalzfeber. Ibidem, Bd. 67, 1911.

Kochsalz und nach Ringer beobachteten und die den bisherigen Untersuchungen beim Erwachsenen nicht entsprechen, hervor, daß ihre zuerst verwandten Lösungen außergewöhnlich stark bakterienhaltig waren.

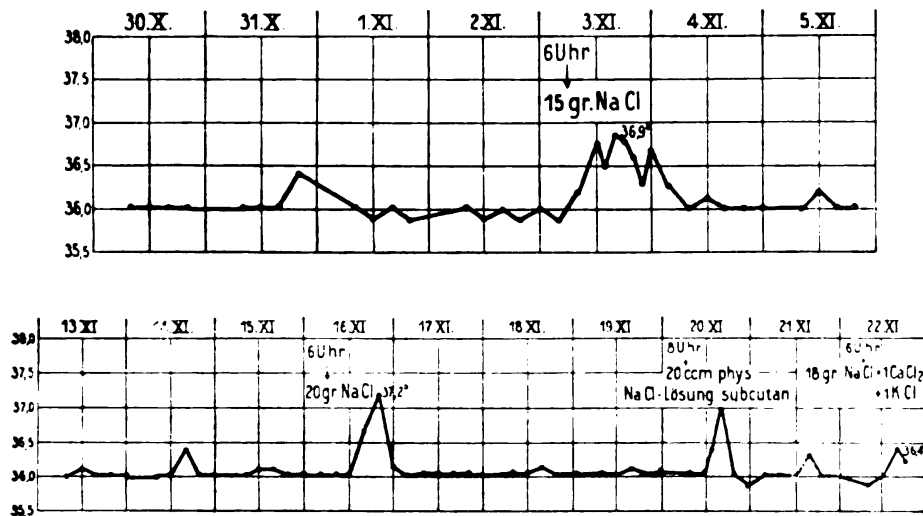
2) Ich kann im folgenden über 10 Versuche an frischen Kaninchen berichten, denen 25 ccm 1-proz. Kochsalzlösung aus dreifach destilliertem Wasser sofort nach der Sterilisation intravenös injiziert worden war.

Tabelle I.

Kan. No.	Gewicht	Temperatursteigerung
1	1500 g	+ 0,6°
2	2200 „	+ 0,7°
3	1700 „	+ 0,7°
4	2500 „	+ 0,7°
5	1800 „	+ 0,8°
6	2200 „	+ 0,8°
7	2200 „	+ 0,9°
8	2400 „	+ 0,9°
9	2500 „	+ 1,2°
10	1100 „	— 1,3°

Das heißt also: in 4 Fällen fragliche Temperatursteigerung, in 5 Fällen Fieber, in 1 Fall (kleinstes Tier) Kollaps. Die durchschnittliche Temperatursteigerung von + 0,85° liegt niedriger, als in meinen früheren Versuchen (Durchschnitt aus 100 Versuchen + 1,2°); doch kommt in dieser Durchschnittszahl die schwerste Einwirkung — der Kollaps bei Tier 10 — nicht zum Ausdruck. Die Tatsache des Kochsalzfiebers beim Kaninchen scheint mir demnach außer Zweifel zu stehen.

3) Schließlich wäre meines Erachtens das Fieber, das L. F. Meyer nach Kochsalzdarreichung per os bei Kindern beobachtet hat und seine Verhütung durch Calcium ganz unerklärbar, wenn es sich um bakterielle Einflüsse irgendwelcher Art handelte. Ich kann hierzu eine Beobachtung über Kochsalzfeber per os bei einem Typhusrekonvaleszenten mit einer fast monothermen Temperaturkurve beibringen, der auf 20 g Kochsalz per os eine Temperatursteigerung bekam, die ausblieb, als er statt dessen 18 g NaCl + 1 g CaCl<sub>2</sub> + 1 g KCl erhielt.



**Krankengeschichte:** C. M., 27 Jahre, klinisch und bakteriologisch sicherer Typhus abdominalis; entfiebert vom 26. IX.—1. X. 1911, dann Rezidiv vom 1.—11. X. 1911; nachher dauernd fieberfrei; gewöhnliche Kost seit 23. X., steht auf seit 25. X.

Erhält am 3. XI.: 15 g NaCl in Wasser per os (um 6 Uhr morgens  
am 16. XI.: 20 g NaCl) nüchtern,  
am 20. XI.: 20 ccm physiologische Kochsalzlösung subkutan,  
am 22. XI.: 18 g NaCl + 1 g CaCl<sub>2</sub> + 1 g KCl per os.  
Wird am 22. XI. abends entlassen.

Aus dem Angeführten geht meines Erachtens mit Sicherheit hervor, daß es ein Fieber durch reine Kochsalzwirkung in der Tat gibt. Der erwachsene Mensch ist wohl allerdings für eine Entscheidung dieser Frage ein ungeeignetes Versuchsobjekt.

*Nachdruck verboten.*

[Aus dem Department of Experimental Therapeutics, Cornell University Medical School, New York City, U.S.A.]

**Bemerkungen zur Arbeit von Dr. P. Kuschakoff, „Zur Frage über die Verwertung der Widerstandsfähigkeit menschlicher Erythrocyten gegenüber Cobragift für die Diagnose der Syphilis“.**

Von **Richard Weil**, New York.

(Eingegangen bei der Redaktion am 11. April 1912.)

In Band XII, Heft 5 der Zeitschrift für Immunitätsforschung erschien eine Arbeit von Herrn Dr. Kuschakoff, der auf Veranlassung und unter der Leitung von A. von Wassermann eine vergleichende Untersuchung der von mir beschriebenen Cobragiftreaktion mit der bekannten Wassermannschen Komplementbindungsmethode unternahm. Es gereicht mir zur großen Freude, daß von so autoritativer Seite die Beobachtung bestätigt wird, „daß das Phänomen der Hemmung der Hämolyse bei einem bedeutenden Teile der Syphilisfälle vorhanden ist“; desto mehr halte ich es für angezeigt, einige, wie es mir scheint, höchst wichtige Schlußfolgerungen des Verfassers kritisch zu beleuchten.

Dr. Kuschakoff sagt am Ende seiner Arbeit, er sei zur „Ueberzeugung gelangt, daß, ohne gleichzeitige Kontrolle durch die Wassermannsche Reaktion, die Reaktion mit Cobragift keinen praktischen Wert besitzt“. Wenn wir nun die Tabellen, die er veröffentlicht, sorgfältig durchsehen, so finden wir merkwürdigerweise unter 67 untersuchten Fällen zweifelloser Syphilis, nur 28 mit Wa.R. positiv reagierten, während 32 auf Cobra reagierten, also 41 Proz. gegen 48,5 Proz.<sup>1)</sup>.

1) Merkwürdigerweise hat sich dieses Verhältnis zwischen den Zahlen der Wa.R. positiven und den Co.R. positiven Fällen, also 7:8, fast absolut prozentisch wiederholt in einer unlängst von Schwartz erschienenen Arbeit. Unter 357 untersuchten Fällen sicherer Lues fand er 218mal positive Wa.R., 241mal positive Co.R., also 7:8. Anders ausgedrückt gab es 61,1 Proz. Wa.R. + gegen 67,5 Proz. Co.R. +. Die niedrige Zahl der positiven Reaktionen in diesen beiden Serien läßt sich dadurch erklären, daß beide einen ziemlich großen Prozentsatz alter latenter Fälle enthalten.

Unter diesen 32 Fällen, die positiv gegen Cobra reagierten, waren 16, also gerade die Hälfte, gegenüber Wa.R. auch positiv, während 16 eine negative Wa.R. zeigten. Es ist ja ohne weiteres klar, daß in diesen letzten 16 Fällen der Verfasser ganz sicher die Reaktion ohne gleichzeitige Kontrolle vermittlels der Wa.R. zu beurteilen vermag, denn in allen diesen Fällen versagte letztere. In derselben Weise sieht man in Tabelle VI, daß unter den 15 Fällen, die vor 8—12 Jahren infiziert waren, die Wa.R. in 4 Fällen ein positives, in 11 Fällen ein negatives Resultat ergab, während die Cobrareaktion in 9 Fällen positiv, in 6 Fällen negativ war. Wenn man nun Rücksicht darauf nimmt, daß unter 21 Kontrollen die Co.R. in keinem Falle (siehe unten) ein positives Resultat ergab, so scheint es wenigstens etwas gezwungen, die Wa.R. als nötige Kontrolle zu beschreiben.

Weiter schreibt Verfasser, daß in „einem Falle von Tuberkulose . . . . . die Cobragiftreaktion positiv war. Es ist also ihre Spezifität nicht genügend“. Was diesen Fall angeht, so möchte ich nur darauf hinweisen, daß in demselben (Tabelle XIII, Fall 10) die Reaktion nur 1 Stunde lang beobachtet war, während es nötig ist, die nach 1 Stunde registrierten Reaktionen nie als endgültige zu betrachten, sondern immer nach 24 Stunden zu revidieren, wie auch vom Verfasser (vgl. Tabelle XIII, Fall 4) anerkannt worden ist.

Daß die Co.R. in vielen Fällen, so in 8 Fällen von Ks. Serie, „bei welchen die Patienten intensiv behandelt worden sind, und die Wa.R. negativ geworden ist“, immer noch positiv ausfällt, gebe ich gerne zu und habe auf diese Tatsache sogar als den speziellen Vorteil dieser Methode in meiner ersten Mitteilung aufmerksam gemacht. Es ist doch von vielen Seiten betont worden, daß die Wa.R. negativ ausfallen kann nach begonnener Behandlung, zu einer Zeit, wo die Lues so wenig als geheilt angesehen werden darf, daß sogar frische Manifestationen, z. B. Hautausschläge, sich zeigen.

Endlich darf ich vielleicht hinzufügen, daß von mehreren Forschern in Amerika die zwei Reaktionen jetzt in vielen Hunderten von Fällen verglichen worden sind, und daß übereinstimmend gefunden worden ist, daß die Cobragiftreaktion spezifisch für Lues ist und daß die Resultate prozentualiter

wenigstens so gut wie bei der Wa.R. sind, gerade so wie sich dieses Faktum in der Serie des Herrn Dr. Kuschakoff geltend macht. Es scheint die Cobrareaktion, im Gegensatz zu den Behauptungen Ks. eben in den Fällen den größten Wert als klinisches Hilfsmittel zu besitzen, wo die Wa.R. im Stich läßt.

Das Wichtigste dabei ist eigentlich nicht, daß man hier ein neues Diagnostikum zur Hand hat, sondern daß, soweit ich weiß, zum ersten Male eine spezifische biochemische Veränderung der Körperzellen, statt des Serums als Folge einer Infektionskrankheit nachgewiesen worden ist. Vielleicht kommt man auch auf diese Weise zu einer Erklärung der biologischen Resistenz der Erythrocyten in Carcinomfällen gegen die Isolysinen, wie ich sie im Jahre 1908 beschrieben habe, und wie sie in letzter Zeit auch von Bürger nachgewiesen worden ist. Weiteres über dieses Thema läßt sich hier natürlich nicht ausführen, und ich muß mich mit einem Hinweis auf meine diesbezüglichen Arbeiten begnügen.

#### Zusammenfassung.

Aus der Arbeit von Dr. Kuschakoff geht hervor, 1. daß die Cobragiftreaktion spezifisch für Lues ist; 2. daß sie eine wichtige Ergänzung der klinischen Hilfsmittel darbietet, indem sie gerade in den Fällen, wo die Wa.R. im Stich läßt, die Diagnose feststellen kann.

#### Literatur.

- 1) Bürger, Zeitschr. f. exp. Pathol. u. Therapie, Bd. 10, 1912, p. 2.
- 2) Schwartz, N. Y. Med. Journal, 1912, Jan. 6.
- 3) Weil, Arch. of Int. Med., 1908, Jan.  
— Journ. of Med. Research., Vol. 19, 1908, p. 2.  
— Journ. of Infect. Diseases, Vol. 6, 1909, p. 5.



*Nachdruck verboten.*

[Aus dem Königl. Institut für experimentelle Therapie zu Frankfurt a. M. (Direktor: Wirklicher Geheimer Rat Prof. Dr. P. Ehrlich).  
Experimentell-biologische Abteilung (Prof. Dr. H. Sachs).]

**Ueber Immunisierung mit ambozeptorbeladenen Blutkörperchen.**

Von Dr. **Karl Altmann.**

(Eingegangen bei der Redaktion am 12. Februar 1912.)

Die Untersuchungen<sup>1)</sup>, über die ich mir im folgenden zu berichten erlaube, nehmen ihren Ausgangspunkt von der durch Friedberger und Moreschi<sup>2)</sup> festgestellten interessanten Tatsache, daß die hämolytische Wirkung der Immunsera durch Antisera, welche durch Immunisieren mit dem Serum der ambozeptorspendenden Tierart gewonnen sind, eine erhebliche Beschleunigung und Verstärkung erfährt. Auf Grund der durch Friedberger und Bezzola<sup>3)</sup> erfolgten weiteren Analyse des Phänomens geht man wohl nicht fehl in der Annahme, daß durch Vermittlung der Antikörper des Eiweißantiserums eine verstärkte Zuleitung resp. Bindung des Komplements an die ambozeptorbeladenen Blutkörperchen bewirkt wird, daß dementsprechend der an die Erythrocyten gebundene Ambozeptor seinerseits befähigt ist, geeignete Eiweißantikörper zu binden, ein Vorgang, den Moreschi<sup>4)</sup> in gleicher Weise für die agglutinierende Serumwirkung feststellen konnte und treffend als Kettenbindung bezeichnet hat. Im Prinzip waren

1) Die vorliegenden Untersuchungen sind bereits vor längerer Zeit abgeschlossen. Ihre Publikation ist durch äußere Ursachen verzögert worden. Ueber einen Teil der Ergebnisse hat bereits Sachs auf der zweiten Tagung der freien Vereinigung für Mikrobiologie kurz berichtet. Cf. Centralbl. f. Bakt., Ref., Bd. 42, 1908, Beiheft.

2) E. Friedberger und C. Moreschi, Centralbl. f. Bakt., Bd. 45, Heft 4, p. 346.

3) E. Friedberger und C. Bezzola, Centralbl. f. Bakt., Bd. 46, Heft 5, p. 412.

4) C. Moreschi, Centralbl. f. Bakt., Bd. 46, p. 49 u. 456.

derartige Beeinflussungen des Ambozeptors durch Antikörper schon früher bekannt durch die Auffindung der immunisatorisch erzeugten Antiambozeptoren, die auf Grund der Untersuchungen von Pfeiffer und Friedberger<sup>1)</sup>, Bordet<sup>2)</sup>, Ehrlich und Sachs<sup>3)</sup> gleichfalls als Antikörper aufzufassen sind, welche durch das dem ambozeptorhaltigen entsprechende Normalserum erzeugt werden können. Der Unterschied zwischen den beiden Erscheinungskomplexen besteht nur darin, daß in dem Falle der Antiambozeptoren die Wirkung der Antikörper auf die beladenen Blutkörperchen eine Hemmung resp. Aufhebung der Hämolyse zur Folge hat, im Falle der Friedberger-Moreschischen Antikörper aber eine Beschleunigung und Verstärkung der Hämolyse resultiert. Ob Antiambozeptoren oder beschleunigende Immunstoffe entstehen, das dürfte wohl, worauf bereits Sachs hingewiesen hat, von der Herkunft der Blutkörperchen und des Ambozeptors, also von der Zusammensetzung des hämolytischen Systems und damit von der zur Antikörperbildung benutzten Tierart abhängen. So entstehen bei Verwendung des meist benutzten Hammel- oder Rinderblutes, wobei der Ambozeptor vom Kaninchen stammt, durch Immunisieren von Ziegen mit Kaninchenserum in der Regel Antiambozeptorwirkungen, dagegen tritt das Friedberger-Moreschische Phänomen ein, wenn Kaninchenblut benutzt wird, der hämolytische Ambozeptor von der Ziege gewonnen ist und das Antiserum vom Kaninchen auf die Injektion von Ziegenserum gebildet wird. In beiden Fällen aber handelt es sich um Antikörper, welche auf die ambozeptorbeladenen Blutzellen wirken. Auf Grund der der Seitenkettentheorie entsprechenden Prinzipien war nun zu erwarten, daß die antikörperbindende Funktion auch in diesem Falle mit der Fähigkeit, Antikörper im Organismus auszulösen, kombiniert ist, und um dieses experimentum crucis für die oben erörterte Auffassung zu erbringen, mußte aus technischen Gründen das von Friedberger und Moreschi zur Demonstration der beschleunigenden Antikörperwirkung verwendete hämolytische

1) R. Pfeiffer und E. Friedberger, Deutsche med. Wochenschr., 1905; Centralbl. f. Bakt., Bd. 41, 1906, Heft 2.

2) J. Bordet, Ann. de l'Inst. Pasteur, T. 18, 1904.

3) P. Ehrlich und H. Sachs, Berliner klin. Wochenschr., 1905, No. 19 und 20.

System besonders geeignet erscheinen. Wollte man nämlich in dem vorliegenden Falle die Identität von antikörperbindender und antikörperbildender Qualität für die Antiambozeptoren erweisen, so würde es sich darum handeln, größere Tiere (Ziegen) mit größeren Mengen ambozeptorbeladener Blutkörperchen vorzubehandeln. Bei dem Beschleunigungsphänomen ergibt sich aber als Forderung, Kaninchen mit ambozeptorbeladenen Kaninchenblutkörperchen zu immunisieren, wobei nur der Ambozeptor von der Ziege stammt. Ich habe daher diese Kombination zur Entscheidung der Frage gewählt.

Wenn man annehmen darf, daß die durch gründliches Waschen mit physiologischer Kochsalzlösung von anhaftenden Serumspuren befreiten ambozeptorbeladenen Kaninchenblutkörperchen ihre antigene Funktion im Kaninchenorganismus lediglich dem gebundenen Ambozeptor verdanken, so ist diese Versuchsanordnung vielleicht auch insofern von Interesse, als sich aus ihren Ergebnissen gewisse Schlußfolgerungen in bezug auf die oft diskutierte Frage nach der Rolle der Ambozeptoren als Eiweißantigene ziehen lassen. Von diesem Standpunkte aus erschien es von Interesse, die durch Vorbehandlung von Kaninchen mit ambozeptorbeladenem Kaninchenblut gewonnenen Immunsera nicht nur auf ihre hämolysebeschleunigende Wirkung zu prüfen, sondern sie auch auf etwa entstandene präzipitierende resp. komplementbindende Antikörper zu untersuchen. Denn wenn man die Antigene der im allgemeinen als Eiweißantikörper zusammengefaßten Immunstoffe als eiweißartig auffaßt, so erscheint bei positivem Ausfall der Immunisierungsversuche der Schluß berechtigt, daß auch die zur Vorbehandlung benutzten ambozeptorbeladenen Blutzellen selbst eiweißartige Antigene enthalten müssen, und die Versuchsanordnung hatte dementsprechend nur dafür Sorge zu tragen, daß bei der Sensibilisierung des Blutes die nicht ambozeptorartigen Antigene nach Möglichkeit entfernt würden.

Die Ausführung meiner Versuche gestaltete sich demnach folgendermaßen:

80 ccm Kaninchenvollblut, serumfrei gewaschen, wurden in 2000 ccm physiologischer Kochsalzlösung suspendiert und mit 60 ccm des hämolytischen Immunserums (von der Ziege durch Injektion von Kaninchenblutkörperchen erhalten)  $1\frac{1}{4}$  Stunde bei 37° digeriert. Darauf dreimaliges Waschen mit physiologischer Kochsalzlösung und zwar das erste Mal mit

15\*

1000 ccm (Waschflüssigkeit A), das zweite Mal mit 1000 ccm (Waschflüssigkeit B), das dritte Mal mit 100 ccm (Waschflüssigkeit C). Nach dem vierten Zentrifugieren wird das Sediment in 80 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen. Davon erhält Kaninchen 1 30 ccm, Kaninchen 2 30 ccm, Kaninchen 3 20 ccm intraperitoneal. Vor der Injektion der beladenen Blutkörperchen wurden die Waschflüssigkeiten auf etwaigen Gehalt an Ziegeneiweiß geprüft. Es zeigte sich, daß bereits nach dem zweiten Waschen die Waschflüssigkeit (B) mit einem durch Injektion von Ochsen Serum erzeugten Antiserum, welches noch mit einer 10000-fach verdünnten Lösung von Ziegenserum deutliche Präzipitation gab, nicht mehr reagierte, trotzdem wurden, um jeden Einwand, daß das injizierte ambozeptorbeladene Blut etwa nicht ganz serumfrei gewaschen sei, 2 Kaninchen (4 und 5) mit je 40 ccm der Waschflüssigkeit C intraperitoneal injiziert.

15 Tage nach der Injektion wurde Serum zur Prüfung auf Antikörperbildung entnommen. Die Tiere erhielten darauf eine zweite Injektion gleicher Mengen des in derselben Weise hergestellten Materials. 11 Tage später wurden sämtliche Tiere entblutet. Ein 6. Kaninchen wurde mit 30 ccm Kaninchenblut vorbehandelt, das mit normalem Ziegenserum in entsprechender Weise wie das mit Immunserum beladene Blut hergestellt war<sup>1)</sup>.

Ueber die Eigenschaften der von den 6 Kaninchen gewonnenen Sera sei im folgenden kurz berichtet.

### I. Präzipitation.

Die Prüfung auf präzipitierende Fähigkeiten erfolgte derart, daß je 1 ccm verschiedener Ziegenserumverdünnungen mit je 0,1 ccm der einzelnen Sera unterschichtet wurden. Die Stärke der Ringbildung ist in der folgenden Tabelle mit +++, ++ und + notiert. Da nach der zweiten Injektion nur eine unwesentliche Steigerung der Präzipitationskraft nachzuweisen war, begnüge ich mich damit, in der Tabelle die nach der zweiten Injektion erhaltenen Resultate wiederzugeben.

Tabelle I.

Verdünnungs- grad des Ziegen- serums	Präzipitierende Wirkung von 0,1 Kaninchenserum auf 1,0 ccm verdünnten Ziegenserums					
	Kan. 1	Kan. 2	Kan. 3	Kan. 4	Kan. 5	Kan. 6
10	—	—	—	0	0	0
100	+++	+++	+++	0	0	0
1000	++	++	++	0	0	0
10000	+	+	+	0	0	0
∞	0	0	0	0	0	0

1) Ein 7., mit dem letztgenannten identisches Versuchstier ging vorzeitig ein, so daß das Serum nicht zur Untersuchung gelangen konnte.

Aus der Tabelle ergibt sich, daß die Kaninchen 1, 2 und 3, d. h. sämtliche mit dem ambozeptorbeladenen Kaninchenblut vorbehandelten Tiere Präzipitine gegen Ziegenserum gebildet haben. Dagegen wurde weder durch die letzte Waschflüssigkeit noch durch Kaninchenblut, das mit normalem Ziegenserum präpariert war, eine Auslösung von Präzipitinen erzielt, wie das negative Ergebnis bei der Untersuchung der Sera der Kaninchen 4, 5 und 6 zeigt.

## II. Komplementbindung.

Zur Prüfung auf komplementbindende Fähigkeiten wurden absteigende Mengen der einzelnen Kaninchensera (nach der zweiten Injektion) in inaktivem Zustande:

in Reihe A mit 0,001 ccm Normalziegenserum,

in Reihe B mit 0,0001 ccm Normalziegenserum,

in Reihe C mit 0,1 ccm physiologischer NaCl-Lösung (Kontrolle) unter Zusatz von je 0,1 ccm Meerschweinchen-serum 1 Stunde bei 37° digeriert, sodann erfolgte Zusatz von 1 ccm 5-proz. Schweineblut und 0,002 ccm hämolytischem Ambozeptor<sup>1)</sup>.

Nach 2-stündigem Verweilen im Brutschrank und 24-stündigem im Eisschrank zeigen die Versuche folgendes Resultat:

Tabelle II.

Ergebnis der Komplementbindungsversuche.

Menge des Kan.-Ser. ccm	Kaninchen 1			Kaninchen 2			Kaninchen 3		
	Reihe A	Reihe B	Reihe C	Reihe A	Reihe B	Reihe C	Reihe A	Reihe B	Reihe C
0,1	0	0	kmpl.	0	0	kmpl.	0	0	kmpl.
0,05	0	0	"	Spur	0	"	0	0	"
0,025	wenig	0	"	kmpl.	mäßig	"	Spur	0	"
0,015	mäßig	f. kmpl.	"	"	kmpl.	"	stark	stark	"
0,01	stark	dgl.	"	"	"	"	f. kmpl.	f. kmpl.	"
0	kmpl.	kmpl.	"	"	"	"	kmpl.	kmpl.	"

1) Als hämolytisches System habe ich für diese Versuche Schweineblut und ein vom Kaninchen durch Injektion von gewaschenem Schweineblut gewonnenes Immunserum benutzt, um die bei Verwendung von Hammel- oder Rinderblut mögliche störende Interferenz auszuschalten. Komplement und Ambozeptor kamen in doppelt lösender Dosis zur Anwendung.

Menge des Kan.-Ser. ccm	Kaninchen 4			Kaninchen 5			Kaninchen 6		
	Reihe A	Reihe B	Reihe C	Reihe A	Reihe B	Reihe C	Reihe A	Reihe B	Reihe C
0,1	kom- plett	kom- plett	kom- plett	kom- plett	kom- plett	kom- plett	kom- plett	kom- plett	kom- plett
0,05									
0,025									
0,015									
0,01									
0									

Die Tabelle zeigt eine vollständige Uebereinstimmung mit dem Verhalten der Sera bei der Prüfung auf Präzipitation, indem auch hier lediglich die mit ambozeptorbeladenem Blut vorbehandelten Tiere komplementbindende Antikörper erzeugt haben.

### III. Hämolysebeschleunigung.

Zur Prüfung auf Hämolyse beschleunigende Stoffe wurden die Sera einerseits in aktivem Zustande, andererseits nach  $\frac{1}{2}$ -stündigem Erhitzen auf  $56^{\circ}$  untersucht, jedoch erübrigt es sich, über die mit aktivem Serum gewonnenen Ergebnisse zu berichten, nachdem ich in einer früheren Arbeit<sup>1)</sup> gezeigt habe, daß in frischem Zustande auch das normale Kaninchen-serum einen nicht unerheblichen Gehalt an Hämolyse beschleunigenden Stoffen besitzt, die sich aber von den Immunstoffen von Friedberger und Moreschi dadurch unterscheiden, daß sie durch das übliche Inaktivieren ihre Wirkung vollständig einbüßen. Dementsprechend übten auch sämtliche aktive Sera eine mehr oder minder starke Beschleunigung der Hämolyse aus. Maßgebend für die Beurteilung ist daher nur das Verhalten der inaktivierten Sera. Zu ihrer Prüfung wurde folgendermaßen verfahren:

Absteigende Mengen der Kaninchensera 1, 2, 3, 4, 6 wurden mit je 1 ccm schwach ambozeptorbeladenen<sup>2)</sup> 5-proz. Kaninchenblutes 1 Stunde bei  $37^{\circ}$  digeriert. Nach dem Zentrifugieren wurden die Sedimente in je 1,75 ccm physiologischer Kochsalzlösung unter Zufügung von 0,1 ccm Meer-

1) K. Altmann, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 8, 1910, Heft 1, p. 24.

2) Der Ambozeptor war von der Ziege durch Vorbehandeln mit Kaninchenblut gewonnen.

schweinchenserum aufgeschwenmt. Das Ergebnis wurde einerseits nach geeignet erscheinender kurzfristiger Beobachtung, andererseits nach dem üblichen 2-stündigen Verweilen bei 37° notiert und ist aus der folgenden Tabelle III ersichtlich.

Tabelle III.  
Ergebnis der Hämolysebeschleunigung<sup>1)</sup>.

Menge des Kan- Ser- ccm	Kaninchen 1		Kaninchen 2		Kaninchen 3		Kan. 4		Kaninchen 6	
	nach 10 Min.	End- resul- tat	nach 40 Min.	End- resul- tat	nach 30 Min.	End- resul- tat	nach 45 Min.	End- resul- tat	nach 30 Min.	End- resul- tat
0,1	kmpl.	kmpl.	f. kpl.	kmpl.	f. kpl.	kmpl.	0	stark	kmpl.	kmpl.
0,05	"	"	dgl.	"	dgl.	"	0	"	"	"
0,025	"	"	mäßig	"	stark	"	0	"	mäßig	"
0,01	wenig	"	"	f. kpl.	mäßig	f. kpl.	0	"	"	"
0	0	stark	0	stark	0	mäßig	0	"	Spur	f. kpl.

Aus der Tabelle ergibt sich, daß in der Tat durch Vorbehandlung mit ambozeptorbeladenem Kaninchenblut die Erzeugung der hämolysebeschleunigenden Immunstoffe von Friedberger und Moreschi gelungen ist. Denn zu einer Zeit, zu welcher das Komplement an und für sich noch keine oder nur spurenweise Hämolyse verursacht hat, ist unter dem Einfluß der Kaninchensera 1, 2 und 3 bereits komplette oder fast komplette Hämolyse eingetreten und auch das Endresultat läßt eine geringgradige Verstärkung der Hämolyse<sup>2)</sup> erkennen. Im Gegensatz dazu ist in dem Serum des Kaninchens 4, das mit der Waschflüssigkeit vorbehandelt war, nicht die geringste hämolysebeschleunigende Wirkung nachzuweisen. Daß die beschleunigenden Stoffe in dem Serum der mit ambozeptorbeladenem Blut vorbehandelten Tiere in der Tat immunisatorisch erzeugt waren, ergibt sich einerseits aus ihrer Thermostabilität, andererseits aus ihrem durch besondere Versuche erwiesenen Uebergang in die Albuminfraktion bei der Dialyse, also aus zwei Eigenschaften, die ich früher (l. c.) als die be-

1) Die Versuche sind in quantitativer Hinsicht nicht direkt miteinander vergleichbar, da nicht alle Sera am gleichen Tage zur Untersuchung gelangten.

2) Neben der Beschleunigung der Hämolyse konnte auch eine deutliche Verstärkung der Agglutination festgestellt werden.

schleunigenden Immunstoffe von den entsprechenden normalen Antikörpern differenzierende Charakteristika beschrieben habe.

Ueberraschend wirkt vielleicht die Tatsache, daß in dem Serum des Kaninchens 6, das mit normalem Ziegenserum behandeltes Kaninchenblut erhalten hatte, hämolysebeschleunigende Immunstoffe nachweisbar sind. Dieses Ergebnis steht in einem gewissen Gegensatz zu den bei der Prüfung auf präzipitierende und komplementbindende Stoffe erhobenen Befunden, denn in dem Serum des Kaninchens 6 konnten weder Präzipitine noch komplementbindende Antikörper nachgewiesen werden (vgl. Tab. I und II). Nun kann man sich ja freilich vorstellen, daß auch das mit normalem Ziegenserum behandelte Blut Antigene aus dem Ziegenserum aufgenommen hat, wenn auch solche in der Waschflüssigkeit nicht mehr nachzuweisen sind. Es ist hierbei einmal zu berücksichtigen, daß das Ziegenserum bereits normalerweise Ambozeptoren für Kaninchenblut enthält und mit deren Bindung auch antigene Eigenschaften an die Blutkörperchen gelangen, dann aber ist an die Möglichkeit zu denken, daß ein unspezifisches Adhäreren von Ziegeneiweiß vorliegt, ein Umstand, auf den ich gleich noch zurückkommen muß.

Wie dem aber auch sei, auffällig ist die Tatsache, daß in dem Serum desselben Kaninchens nur beschleunigende Stoffe, aber weder Präzipitine noch komplementbindende Antikörper nachweisbar waren. Da meine Erfahrungen nur ein einziges Versuchstier betreffen, so kann man ihnen freilich nur ein kasuistisches Interesse beilegen, und die Klärung muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben. Sollte sich der Befund aber bestätigen, so würde er vielleicht darauf hindeuten, daß der Nachweis von Antikörpern mittelst des Beschleunigungsphänomens eine größere Schärfe besitzt als der Antikörpernachweis mittelst Präzipitation und Komplementbindung.

Wenn ich die Ergebnisse der mitgeteilten Immunisierungsversuche zusammenfasse, so erweist sich zunächst die Forderung, daß dasselbe Agens, welches Antikörper bindet, dieselben auch im Organismus auszulösen imstande sein muß,



für die Kombination von ambozeptorbeladenem Blut und hämolysebeschleunigenden Immunstoffen als erfüllt. Gleichzeitig haben die erörterten Versuche aber auch gezeigt, daß, ebenso wie dies bei der Immunisierung mit normalem Serum der Fall ist, auch bei der Vorbehandlung mit ambozeptorbeladenem Blut Antisera erhalten werden, welche nicht nur hämolysebeschleunigend, sondern auch präzipitierend und komplementbindend wirken. Dieser Parallelismus deutet auf einen engen Zusammenhang zwischen den für die Antiserumwirkungen verantwortlichen Antigenfunktionen hin, und wenn man die gründlich gewaschenen ambozeptorbeladenen Blutkörperchen als nur aus Erythrocyten und Ambozeptor bestehende Komplexe auffaßt, so muß man dazu gelangen, den Ambozeptoren den Charakter als Eiweißantigene zu vindizieren. Inzwischen sind von Braun<sup>1)</sup> Versuche mitgeteilt worden, welche insofern die meinigen bestätigen, als auch sie ergeben haben, daß der an die Zelle verankerte Ambozeptor als Antigen wirken kann. Braun hat nämlich gezeigt, daß man mit Pneumokokken, welche mit Pneumokokkenserum vom Pferde sensibilisiert waren, beim Meerschweinchen aktive Anaphylaxie gegen Pferdeserum erzeugen kann, und er schließt daraus, daß den im Pneumokokkenserum vorhandenen Antikörpern der Charakter der anaphylaktogenen Antigene zukommt. Allerdings sind gegenüber diesen Befunden nicht mit Unrecht Einwände erhoben worden, die im Prinzip auch auf unsere Befunde übertragen werden können. Doerr und Moldovan<sup>2)</sup> (vgl. auch Doerr<sup>3)</sup>) verweisen nämlich auf Versuche von Levaditi und Rajchman<sup>4)</sup>, welche durch Meerschweinchenerythrocyten das Anaphylaktogen des Pferdeserums adsorbierten, und auf ähnliche Untersuchungen von Sleeswijk<sup>5)</sup> und Salus<sup>6)</sup>, in denen es sich um eine Adsorption

1) Braun, Zeitschr. f. Immunitätsf. etc., Bd. 3, 1909, Heft 6, p. 561.

2) R. Doerr und J. Moldovan, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 5, 1910.

3) R. Doerr, diese Zeitschr., Ref., Bd. 2, 1910.

4) C. Levaditi und Rajchman, Compt. rend. Soc. de Biol., T. 67, No. 29, 1909.

5) Sleeswijk, diese Zeitschr., Bd. 2, 1909.

6) G. Salus, Med. Klinik, 1909.

durch Blutkörperchen oder durch Bariumsulfat handelt. Doerr und Moldovan selbst konnten nachweisen, daß man auch durch Injektion mit normalem Serum vorbehandelter Kreide, Staphylokokken, Hefezellen trotz vielfachen Waschens Meerschweinchen gegenüber der gleichen Serumart anaphylaktisieren kann, und die Autoren schließen daraus, daß die Versuche Brauns einen Schluß auf die antigenen Eigenschaften der Antikörper nicht zulassen. Auch Landsteiner und Prašek<sup>1)</sup> haben über die Aufnahme von präzipitablen Substanzen aus verschiedenartigen Seris durch Blutkörperchen berichtet, welche sie allerdings an Kochsalzlösung zum Teil wieder abgeben. Freilich wird man wohl zu berücksichtigen haben, daß Blutkörperchen nicht ein derartiges Absorptionsvermögen besitzen dürften, wie es nach allen Erfahrungen den Bakterien und anderen Stoffen (Kreide, Hefe etc.) zukommt, und auch die scheinbar dem widersprechenden Versuche von Levaditi und Rajchmann, sowie Sleeswijk sind vielleicht einer anderen Deutung zugänglich. Denn die Sera enthalten ja bereits normalerweise in mehr oder weniger hohem Maße Antikörper gegenüber fremdartigen Blutzellen, und wenn es den genannten Autoren gelungen ist, gerade an Meerschweinchenblutkörperchen aus dem Pferdeserum antigene Stoffe zu binden, so ist daran zu erinnern, daß das Pferdeserum Antikörper (Agglutinine und Ambozeptoren) für Meerschweinchenblutkörperchen enthält, deren intensive Verankerung besonders durch das von Bordet und Gay<sup>2)</sup> analysierte Phänomen der Konglutination demonstrierbar ist<sup>3)</sup>. Es liegt daher nicht ohne weiteres Anlaß vor, bei einer Adsorption des Anaphylaktogens des Pferdeserums an Meerschweinchenblutkörperchen einen unspezifischen Vorgang anzunehmen,

1) K. Landsteiner und E. Prašek, diese Zeitschr., Bd. 10, 1911, p. 68.

2) J. Bordet und F. P. Gay, Annales de l'Inst. Pasteur, T. 20, 1906, und T. 22, 1908.

3) In bezug auf das Verhalten der aus normalem Pferdeserum an das Meerschweinchenblut gebundenen Ambozeptoren und Komplemente sei auch auf die Arbeiten von Streng (diese Zeitschr., Bd. 1, 1908) sowie Moreschi und Perussia (diese Zeitschr., Bd. 11, 1911) verwiesen.

wenn auch ein solcher a priori nicht ausgeschlossen werden kann.

In unseren Versuchen dürfte eine wesentliche unspezifische Adsorption des Ziegenserumeiweißes durch das Kaninchenblut kaum in Frage kommen, soweit man allerdings aus meinem in dieser Hinsicht geringfügigen Material einen Schluß zu ziehen berechtigt ist. Es hat sich ja gezeigt, daß nur die mit Immunserum beladenen Blutkörperchen Präzipitine und komplementbindende Antikörper erzeugt haben, und die Bildung von hämolysebeschleunigenden Stoffen nach der Injektion der mit Normalserum beladenen Kaninchenblutkörperchen könnte man vielleicht, wie schon erwähnt, auf eine Bindung normaler Ambozeptoren beziehen.

Wenn aber auch die starke antigene Wirkung der ambozeptorbeladenen Blutkörperchen wohl kaum allein auf eine unspezifische, auch normalen Blutkörperchen zukommende Eiweißadsorption zu beziehen sein dürfte, so bin ich mir wohl bewußt, daß noch ein anderer Einwand in Betracht kommt. Es könnte nämlich sein, daß durch die Wirkung der im Immunserum enthaltenen Ambozeptoren und Agglutinine die physikalisch-chemische Beschaffenheit der Blutzellen eine derartige Veränderung erfährt, daß sie nunmehr ein wirksames Adsorbens darstellen. Ich selbst verfüge nicht über hinreichende Erfahrungen, welche diesen Einwand vollständig auszuschalten vermögen, jedoch darf man nach den neueren interessanten Untersuchungen von Landsteiner und Prašek<sup>1)</sup>, welche sich eingehend mit den Beziehungen der Antikörper zu der präzipitablen Substanz des Serums beschäftigen, wohl annehmen, daß die Aufnahme der präzipitablen Substanz als unspezifische Adsorption durch agglutinierte Blutkörperchen nicht wesentlich in Betracht kommt. Auf die Literatur über den hier interessierenden Gegenstand glaube ich nicht näher eingehen zu müssen, da dieselbe erst kürzlich in der Arbeit von Landsteiner und Prašek, sowie ganz neuerlich von Doerr und Pick<sup>2)</sup> ausführlich diskutiert worden ist. Die

1) K. Landsteiner und E. Prašek, l. c.

2) R. Doerr und F. Pick, Centralbl. f. Bakt., Bd. 62, 1912, Heft 1 und 2.

Autoren gelangen übereinstimmend auf Grund eigener Untersuchungen zu der Auffassung, daß die Antikörper den Charakter als Eiweißantigene besitzen, ein Schluß, den auch ich auf Grund der in der Literatur vorliegenden und der in dieser Arbeit mitgeteilten Erfahrungen ziehen zu dürfen glaube.

### Zusammenfassung.

Durch Immunisieren mit ambozeptorbeladenen Blutkörperchen wurden Antisera erhalten, welche mit dem Serum der den Ambozeptor liefernden Tierart Präzipitation und Komplementbindung ergaben und auf gleichartige ambozeptorbeladene Blutkörperchen hämolysebeschleunigend wirkten. Ein Antiserum, das durch Vorbehandeln von Blutkörperchen, welche mit dem homologen Normalserum digeriert waren, gewonnen wurde, ergab Hämolysebeschleunigung, wirkte aber nicht präzipitierend und komplementbindend. Da es sich im letzteren Falle nur um ein einziges Antiserum handelt, erscheinen bestimmte Schlußfolgerungen nicht angängig.

Es wird die Bedeutung der mitgeteilten Versuche für die Frage der Antigennatur der Ambozeptoren erörtert. Soweit die antikörperbindende Funktion in Betracht kommt, erscheint der Beweis der antigenen Funktion des Ambozeptors bereits durch die Demonstration des Friedberger-Moreschischen Beschleunigungsphänomens erwiesen. Denn wenn man auch für die entsprechende agglutinationsbeschleunigende Wirkung der Immunsera mechanische Umstände verantwortlich machen könnte, so kann man doch die beschleunigende Antikörperwirkung bei der Hämolyse nur als die Folge einer Einwirkung auf den Ambozeptor ansehen.

*Nachdruck verboten.*

## **Notes on the Chemotherapeutic Treatment of Biliary Fever in Dogs<sup>1)</sup>.**

By Dr. **K. F. Meyer,**

Professor of Veterin. Pathology and Bacteriology, University of Pennsylvania,  
and Director of the Laboratory of the State Livestock Sanitary Board.

(Eingegangen bei der Redaktion am 13. Februar 1912.)

For a long time chemotherapeutic attempts have been made with varying results to cure this fatal disease — canine piroplasmosis. Lately Nuttall and Hadwen, Jowett, and others, reported on the successful treatment by means of dyes belonging to the Benzidine "Naphthyl-aminsulfo" group. In a short note Nuttall refers to all the drugs used in the treatment of biliary fever during recent years and I think therefore it is not necessary for me to recapitulate all the literature on the subject. Amongst the medicaments which exerted the greatest influence on the piroplasma Trypan-Red and Trypan-Blue are found. In his first report he mentioned two cases where the Trypan-red treatment was successful, but he did not directly recommend it for treatment in the field. Since the results obtained in the treatment of trypanosomiasis with Trypan-red did not bear out the success promised by the first experiments, it was natural that the results obtained with the chemicals mentioned above for the treatment of piroplasmosis were also accepted with a certain scepticism, because the virulency, variability, etc., of the different strains of virus used for such experiments are important factors to be taken into consideration. We thought an experiment on a number of animals would be the best means of testing the conclusions of Nuttall and his co-worker. It may be mentioned here that in a country where piroplasmosis is very

---

1) The experiments were carried out in the Veterinary Bacteriological Institute of the Department of Agriculture of the Transvaal, South Africa, in 1909/10. For complete records of experiments consult Report of the Government Veterinary Bacteriologist for the year 1909/10. Pretoria 1911, p. 124—150.

frequent, only a test on a number of animals would exclude cases of partial immunity found in dogs from affecting the results. About twenty-four dogs were especially devoted to the Trypan-red treatment, and a few others were used for Trypan-blue, and one for brilliant green. We used different strains of virus and animals of different ages, with sufficient controls.

(A) Trypan-Red. — Trypan-red is chemically a tetrazo compound of benzidin-monosulphate and 2, 3, 6,  $\beta$  naphthyl-amin disulphonate of sodium. It was used for the first time by Ehrlich and Shiga for the treatment of trypanosomiasis. The administration of the drug was always carried out with a freshly-prepared solution in sterile water (1 to 5 per cent.), and injected subcutaneously. In a few cases intravenous injections were also used, but later we returned to the old method of subcutaneous injection. It was observed in several cases that the application of toxic substances, such as Trypan-red, had an influence on the secreting organs, and especially on the kidneys, which are doubtless primarily affected by the piroplasmiasis. The breakdown of the red blood corpuscles seems also to be accelerated by the injection of Trypan-red into the blood stream, and haemoglobinuria was always observed as a sequel of this treatment. With regard to the subcutaneous application, the following may be noted: Occasionally abscesses at the seat of the injection were observed. In a few cases they were probably due to the working with non-sterile instruments, but individual disposition, as often observed in human beings, favours as a sequel of the injection of chemical composition an irritation and local swellings, with the formation of sterile pus. My observations support the idea that a subcutaneous injection of the drug was never followed by a local swelling if freshly prepared and filtered solutions were used. If a muscle was wounded, or if it happened that the whole drug was injected into a muscle, local irritation was always present. Considerable necrosis and similar lesions were once observed in a horse as a sequel to such an inoculation, where a part of the brachio-cephalic muscle was finally eliminated by a process of demarcation. All these accidents could be avoided if carried

out subcutaneously. The seat of the inoculation in dogs was always, on the back between the two shoulders; after the skin was disinfected with alcohol the inoculation was made. A 1 and 2 per cent. solution, inoculated in a dose of 3 to 5 c.c. at one place, proved to be most suitable. For intravenous inoculation, 1 per cent. solution, by preference at body temperature, was used. The effect of the drug on the body of the animal was demonstrated by a red discolouration of the conjunctiva, mucous membrane of the mouth, etc., about two and a half to three hours after injection. This discolouration takes a dark-reddish or slightly-yellowish tinge about eight hours after the application of the drug. Varying with the quantity of Trypan-red inoculated these symptoms disappear in about a fortnight, but often not before six weeks after the last administration of Trypan-red. In several cases elimination through the urine could be observed. In all cases where recently treated dogs died the post-mortem examination showed in the organs a dark-reddish discolouration more or less influenced by the general jaundice.

#### **The experimental animal.**

In our experiments only dogs artificially infected by inoculation of blood containing *P. canis* were treated. The control of the infected dogs was made by observing symptoms and by thorough microscopical examination of the blood. Clinically all the dogs treated were obviously ill. The disease was produced with four different strains, because it is a well-known fact that the virulency of the different piroplasma strains differs, and naturally the results vary. It was necessary to use a great number of experimental dogs as controls, to exclude partial immunity, which would naturally influence the experiments. It was first expected that the results of the treatment would be better than those obtained in Europe, because this partial immunity would beneficially assist the effect of the drugs. In several cases treated by Jowett with Trypan-blue, this was probably the case. Altogether eighty-eight dogs were infected and all were kept under the same conditions without any special nursing.

The two cases recorded by Nuttall and Hadwen are just the contrary of two experiments carried out by Levi-della Vida in 1907. In both cases there were only two dogs for the experiment, and therefore they cannot be considered to be convincing. The number of the animals used, distributed among the different strains, was as follows:

**Original strains:**

Dog with acute piroplasmosis—Pretoria strain.

Dog with acute piroplasmosis—Johannesburg strain.

Dead dog: Chronic piroplasmosis—Onderstepoort strain 1.

Living pup: with chronic piroplasmosis—Onderstepoort strain 2.

The number of dogs used for the different strains was as follows:

Injection of 8 dogs—Pretoria strain.

Injection of 50 dogs—Johannesburg strain.

Injection of 9 dogs—Onderstepoort strain 1.

Injection of 21 dogs—Onderstepoort strain 2.

Total number, eighty-eight dogs, subcutaneously inoculated with virulent blood in a quantity of 2 to 5 c.c. for each animal.

**They were treated as follows:**

**Trypan-red:**

Pretoria strain	2 (665 and 666).
Johannesburg strain	15 (653, 660, 624, 735, 738, 744, 752, 756, 701, 721, 839, 675, 732, 687, and 739).
Onderstepoort strain 1	3 (795, 799 and 786).
Onderstepoort strain 2	4 (840, 842, 846 and 848).
Total	24 animals.

**Trypan-blue:**

Onderstepoort strain 2	2
Johannesburg strain	2
Total	4 animals.

**Brilliant-green:**

Onderstepoort strain 2	1
	1 animal.

Total number of dogs treated 29

**As control dogs were used in the different experiments:**

Pretoria strain	2 (608 and 667).
Johannesburg strain	17 (669, 670, 671, 731, 733, 740, 745, 680, 690, 753, 757, 677, 685, 689, 704, 834, 902).
Onderstepoort strain 2	3 (794, 805, and 798).
Onderstepoort strain 2	10 (835, 841, 836, 844, 847, 872, 873, 847, 876, and 896).

Total number of controls used 32 animals.

Of the remaining dogs used the following had to be considered to be immune or partially immune:



Pretoria strain	4 = 50 per cent.
Johannesburg strain	16 = 32 " "
Onderstepoort strain 1	3 = 33 " "
Onderstepoort strain 2	4 = 19 " "
Total number of immune dogs	27 = 31 per cent.

The dogs treated with Trypan-red were distributed amongst the following strains:

Pretoria strain	2
Of these two were used and both died. Mortality, 100 per cent.	
Johannesburg strain	15
Five alive, ten died. Mortality, 67 per cent.	
Onderstepoort strain 1	3
Three died. Mortality, 100 per cent.	
Onderstepoort strain 2	4
One alive, three died. Mortality, 75 per cent.	

Of the twenty-four dogs treated with Trypan-red six are living and eighteen died, the mortality being therefore 75 per cent.

Comparison with the mortality of the controls, which is 81 per cent., and is as follows:

Controls in Pretoria strain	2
Two died. Mortality, 100 per cent.	
Johannesburg strain	17
Six alive, eleven died. Mortality, 65 per cent.	
Onderstepoort strain 1	3
Three died. Mortality, 100 per cent.	
Onderstepoort strain 2	10
Ten died. Mortality, 100 per cent.	
Total number of controls	32

Of these thirty-two dogs six are living and twenty-six died; the mortality therefore is 81 per cent.

Only those dogs which showed 0.1 to 0.3 per cent. of red blood corpuscles infected for a few days, or never revealed any parasites in the blood, were counted as partially or completely immune. This number corresponds with the observations made in other experiments on this matter.

The records given above are contrary to those of Nuttall's experiments, and indicate that Trypan-red had no efficacious influence on canine piroplasmiasis. I think we may here make the statement based on twenty-seven treated dogs and thirty-two control dogs that the therapeutic value of Trypan-red is very small. An influence on the numbers of the parasites as a sequel of the injection, was always noted, but it never had

the effect shown in the records of Nuttall and Hadwen. Sooner or later, and often just after the inoculation, the parasites reappeared in the blood, and generally increased in number, naturally causing the death of the animal. The influence of a second, a third, or a fourth inoculation of Trypan-red exerted no visible effect on the piroplasms, a fact which is well known in all chemotherapeutic experiments, because the parasites become accustomed to the toxin. In our cases they were "Trypan-red resistant". Utilizing the statements on the mode of development of *P. canis* by Nuttall and Graham Smith, and using his terms<sup>1)</sup>, the effect of the drug on the morphology of *piroplasma canis* in as follows:

The pyriform parasites are the first affected. They disappear for a short while, but reappear later in great numbers. The regularity with which they appeared in the records of Nuttall and Hadwen in the control dogs, as well as in the treated dogs, was never present in my experiments in such a manner as to allow this fact to be used for a comparative criticism. Control dogs often showed numbers of parasites which were higher than those in the treated dogs, but yet they recovered from the disease.

From the records which are attached we can state that probably only in those cases where a partial immunity was present could any effect of the drug be demonstrated. The presence of parasites in an untreated and two treated animals is shown hereunder. It will be seen that the influence is not pronounced.

Record of treated dog.

	9	12	2	4	6 o'clock.
Percentage of red blood corpuscles infected	2.3	—	1.2	0.7	0.2
Percentage of p.p.	0.7	—	0.1	0.1	0.0

Record of treated dog (660). 7th October, 1910.

At two-hour intervals	9	12	2	4	6	8	10	12 o'clock.
Percentage of infected red blood corpuscles	7.	Tr.	5.2	12.4	2.4	0.8	0.2	2.2
Percentage of	1.8	Tr.	2.2	4.6	1.4	0.2	0.0	0.6

1) P—Pyriform parasite.

PP—2 Pyriform parasites.

O—Amoeboid parasite.

D—Dividing form.

PPPP—4 Pyriformparasites, and so on.

Record of treated dog (665). 7th October, 1910.

At two-hour intervals.	9	12	2	4	6	8	10	12 o'clock.
Percentage of red blood corpuscles	5.8	Tr.	11.0	9.8	0.6	2.6	6.4	5.6
Percentage of	1.6	Tr.	4.4	6.4	0.0	1.0	2.4	1.8

These records demonstrate that a slight decrease of parasites takes place continuously towards the evening. In other cases it was demonstrated that the number is always varying between the morning and the evening, and that especially in the evening the number of parasites is very low. On the other hand it is shown that as a sequel of the treatment in the hours following injection, a distinct increase and then a decrease of the parasites took place. The decrease is partly due to the effect of the drug, which is visible in six to eight hours, and partly to the daily variations. The increase after inoculation is due probably to the effect of the drug on the blood vessels, the tonus decreasing, and more infected blood corpuscles, which lay generally along the blood vessels, find access into the circulation. The well-marked decrease, as is described in one case by Nuttall and Hadwen was never observed by me as a sequel of Trypan-red injection. That a second inoculation never had the same effect as the first is demonstrated in the records, and the observations therein correspond with all the similar experiments on trypanosomiasis. Whether the parasites are really killed under the influence of Trypan-red is doubtful. The degenerative symptoms are very insignificant, as was demonstrated. I think that only further experiments will give a definite decision. The fact that under these conditions the curative effect is very small, is quite clear.

Generally speaking, all the dogs which recovered passed through the disease in a way similar to that observed in chronic piroplasmiasis: piroplasma disappeared and reappeared irregularly.

An "immunitas sterilisans magna" in the sense of Ehrlich could therefore not be expected, a fact which was also demonstrated by Nuttall.

(B) Trypan-Blue. — This drug is chemically a tetrazo compound of toluidine and amidonaphthol-sulphonate of sodium, and with this dye the conditions of treatment and the curative

effect are different. My experiments were only few in number and therefore do not allow of a definite decision.

As is shown in the following records, compared with the control dog in the Trypan-red experiment, the effect is pronounced.

Record of dog (875). 27th January 1910.

	10	12	2	4	6 o'clock
Percentage of red corpuscles infected	8.2	1.6 Tb.	2.2	0.3	0.5
Percentage of p.p.	1.7	0.4	0.6	0.0	0.0

The parasites disappeared on the 28th, and reappeared on the 7th February (thirteen days) in increased numbers.

Record of dog (878). 24th January 1910.

	10	12	2	4	5	8	10 o'clock
Percentage of red blood corpuscles infected	2.1	Tb.	2.7	Not. ex.	0.5	0.6	0.5
Percentage of p.p.	1.1	Tb.	1.5	Not.	0.0	0.0	0.0

The parasites disappeared on the 27th of January and reappeared on the 3rd February (seven days afterwards) in increasing numbers.

From these records the following deductions may be made:

(1) The parasites in a typical case of canine piroplasmiasis disappeared after a Trypan-blue injection during the next twenty-four hours, when 1.6 per cent. blood corpuscles were infected, and another case forty-eight to sixty hours after the inoculation. As was stated by Nuttall and Hadwen the pyriform parasite disappeared entirely.

(2) About six or ten days afterwards relapses were observed. This observation corresponds with the results in practice, because very frequently an acute case of piroplasmiasis passes under the influence of the treatment to a chronic case, and as was stated by Nuttall and Hadwen and Jowett, a secondary injection has not the same deleterious effect as the first inoculation. The conditions of the resistance were therefore the same as were observed a long time ago by Ehrlich and his pupils, in trypanosomiasis. Microscopically the system of degeneration of the intracorporeal parasites are more pronounced than in Trypan-red treatment.

(C) Brilliant-green. — Only one dog was treated with this drug. It did not seem to have any influence on the piroplasma, but on the other hand the dog had probably

partial immunity, and therefore recovered from the disease. The case is an illustrative example to demonstrate the effect of a drug in partially immune dogs. The results obtained by Nuttall are just the contrary, and it shows the difficulty of drawing conclusions from experiments on these lines in a country where piroplasmosis is very frequent.

**Conclusions.** — From the experiments carried out for the demonstration of the curative effect of two drugs, the following deductions may be made:

(1) The drug Trypan-red, tested on twenty-four dogs, had no efficacious effect. Eighteen dogs (75 per cent.) succumbed to piroplasmosis infection. The six remaining dogs which recovered are, compared with the control dogs, partially immune, and therefore useless for judging the results.

(2) The drug Trypan-blue, tested in four cases, demonstrated a marked effect on the parasites, and had therefore also an effect on the recovery from a piroplasmosis infection. The number of animals treated is really too small to allow of a definite decision. It would be advisable to control the records of Nuttall, Hadwen and Jowett in the same way as is done in my experiments for Trypan-red.

#### Zusammenfassung.

1) Trypanrot hat keinen kurativen Effekt auf südafrikanische Hundepiroplasmose. Beinahe 100 Proz. der behandelten Tiere erlagen der künstlichen Infektion, wo dies nicht der Fall war, muß eine teilweise Immunität angenommen werden.

2) Trypanblau zeigte größeren parasitotropen Einfluß auf *Pirosoma canis*. Jedoch erlauben die wenigen Experimente keine bindenden Schlüsse. Weitere Versuche mit der gleichen Versuchsanordnung wären angezeigt.

#### References.

- (1) Jowett, W., Agricultural Journal, Cape of Good Hope, Vol. 35, p. 429 and 442. An abstract also appeared in the Veterinary Journal, Vol. 65. Veterinary News, London, Vol. 6, p. 625, 626.
- (2) Nuttall, G. H. F., Parasitology, Vol. 2, No. 4, February 1910, p. 409—434.
- (3) — and Graham Smith, G. S., Parasitology, Vol. 1, p. 220—226.
- (4) — and Hadwen, S., Parasitology, Vol. 2, p. 156—191.
- (5) — — Parasitology, Vol. 2, p. 229—235.

*Nachdruck verboten.*

[Aus dem Königl. Institut für experimentelle Therapie zu Frankfurt a. M. (Direktor: Wirkl. Geh.-Rat Prof. Dr. P. Ehrlich).]

### **Beiträge zur Kenntnis der bakteriziden Komplemente.**

Von Stabsarzt Dr. **K. E. Boehncke**,  
Mitglied des Instituts.

(Eingegangen bei der Redaktion am 15. Februar 1912.)

Dem hämolytischen Komplement hat man in letzter Zeit besondere Aufmerksamkeit geschenkt. Namentlich durch die Untersuchungen von Ferrata, Sachs und Teruuchi, Brand, Hecker u. v. a. ist es gründlich erforscht worden, mit dem wichtigen Resultat, daß die Komplementwirkung des frischen Meerschweinchenserums nicht als die Funktion eines einheitlichen Stoffes, sondern als die Resultante der Wirkungen zweier Serumbestandteile, die sich im salzarmen Medium voneinander trennen lassen, aufzufassen ist. Der eine Teil, das nach Brand sogenannte Mittelstück, geht in die Globulinfraktion über, während der andere in dem übrig gebliebenen Serumabguß sich befindet und als Endstück bezeichnet wird.

Da nun zwischen der hämolytischen und bakteriziden Komplementwirkung in vielen Beziehungen große Analogien bestehen, so lag die Wahrscheinlichkeit nahe, daß auch der Bau des bakteriziden Komplements derselbe sein wird, wie der des hämolytischen.

Liefmann und Stutzer waren die ersten, die beide vergleichend untersuchten und auf Grund ihrer Untersuchungsergebnisse die überraschende Behauptung aufstellten, daß die gesamte bakterizide Komplementwirkung nur dem hämolytischen Endstück ganz allein zukommt. Während also zur Hämolyse das Zusammenwirken zweier verschiedener Serumbestandteile notwendig ist, genügte ihnen zur Bakteriolyse (von Choleravibrionen) die Endstückfraktion. Diese auffällige Tatsache vermochte Braun, der die bakteriziden Komplemente in dieser Richtung untersuchte, nicht zu bestätigen. Er kam vielmehr zu dem Resultat, daß das bakterizide Kom-

plement denselben Bau zeigt wie das hämolytische, und daß die bakterizide Komplementwirkung genau so wie die hämolytische die Resultante ist der Funktion zweier Serumbestandteile, von denen einer in der Globulinfraktion, der andere im Serumrest nachweisbar ist. Zu dieser Ansicht ist inzwischen auch Liefmann auf Grund erneuerter Untersuchungen gelangt, wie aus seiner Mitteilung auf der 5. Tagung der Vereinigung für Mikrobiologie hervorgeht (Centralbl. f. Bakt., Referate, Bd. 50, 1911, p. 149).

Der Parallelismus in der Wirkungsart der beiden Komponenten zeigte sich nach Braun als ein ziemlich vollständiger. Nur insofern fand er in seinen Versuchen eine Differenz gegenüber dem hämolytischen Komplement, als sich im bakteriziden Versuch die Wirksamkeit des in Kochsalzlösung aufbewahrten Mittelstücks, der sogenannten Brandschen Modifikation, bei späterem Endstückzusatz nicht nachweisen ließ. Jedenfalls schien es in Anbetracht der (heute freilich nicht mehr bestehenden) Differenzen zwischen den Angaben von Liefmann und Stutzer einerseits, sowie Braun andererseits, nicht ohne Interesse, eine erneute Analyse über die Wirkungsart der bakteriziden Komplemente vorzunehmen. Die nachstehend veröffentlichten, auf Anregung von Herrn Prof. Sachs unternommenen Untersuchungen fanden bereits im vergangenen Sommer ihren Abschluß, jedoch war Verfasser aus zwingenden äußeren Gründen an ihrer früheren Veröffentlichung verhindert.

Zur Spaltung des Komplements diente einmal die von Sachs und Altmann angegebene Methode der Salzsäuretrennung, die auch Liefmann und Stutzer, sowie Braun bei ihren Untersuchungen angewendet hatten. In einer weiteren Reihe von Versuchen verwendete ich, und wie sich zeigte auch mit gutem Erfolge, die von Liefmann zuerst angewendete Trennung mittels Einleitung von Kohlensäure. Bei beiden Methoden ließ sich, wie die Kontrollen zeigten, ein steriles Arbeiten ohne größere Schwierigkeiten erreichen. Zu den Plattenversuchen benutzte ich 24-stündige Bouillonkulturen von Cholera vibrios, wo nicht anders bemerkt, in einer Verdünnung von 1:500 (450 ccm physiol. Kochsalzlösung + 50 ccm Bouillon). Als Ambozeptor diente ein hochwertiges,

Tabelle I.

Versuch I und II: Komplementtrennung nach Sachs und Altmann mit  $N_{150}$  Salzsäure.

III " IV: " " " "  $N_{500}$  " "

V: " " " "  $N_{575}$  " "

VI " VII: " " " " Liefmann mit  $CO_2$ .

M bedeutet Mittelstück, E = Endstück.

1. Mittelstück allein:

$\frac{1}{10}$ M + NaCl + Bakt. + I.-Ser. $\frac{1}{100}$	Resultat I	Resultat II	Resultat III	Resultat IV	Resultat V	Resultat VI	Resultat VII
$\frac{1}{10}$ + 0 + 0,2 + 1,0	ca. 5 000	ca. 10 000	ca. 100 000	ca. 100 000	ca. 100 000	ca. 100 000	ca. 100 000
0,5 + 0,5 + 0,2 + 1,0	"	10 000	mehrere 100 000	ca. 100 000	ca. 100 000	ca. 100 000	ca. 100 000
0,25 + 0,75 + 0,2 + 1,0	ca. 10 000	dgl.	ca. 100 000	ca. 100 000	ca. 100 000	ca. 100 000	ca. 100 000
0,1 + 0,9 + 0,2 + 1,0	"	"	ca. 100 000	ca. 100 000	ca. 100 000	ca. 100 000	ca. 100 000

2. Endstück allein:

E ( $\frac{1}{10}$ M.-S.) + NaCl + Bakt. + I.-Ser. $\frac{1}{100}$	Resultat I	Resultat II	Resultat III	Resultat IV	Resultat V	Resultat VI	Resultat VII
$\frac{1}{10}$ + 0 + 0,2 + 1,0	ca. 100 000	ca. 5 000	ca. 100 000	ca. 100 000	ca. 100 000	ca. 100 000	ca. 100 000
0,5 + 0,5 + 0,2 + 1,0	ca. 100 000	"	dgl.	ca. 100 000	ca. 100 000	ca. 100 000	ca. 100 000
0,25 + 0,75 + 0,2 + 1,0	ca. 100 000	dgl.	ca. 100 000	ca. 100 000	ca. 100 000	ca. 100 000	ca. 100 000
0,1 + 0,9 + 0,2 + 1,0	ca. 100 000	"	ca. 100 000	ca. 100 000	ca. 100 000	ca. 100 000	ca. 100 000

3. Endstück + Mittelstück, gleichzeitig zugesetzt (im Verhältnis 5,0 + 0,5).

M + E + NaCl + Bakt. + I.-Ser. $\frac{1}{100}$	Resultat I	Resultat II	Resultat III	Resultat IV	Resultat V	Resultat VI	Resultat VII
$\frac{1}{10}$ + 0 + 0,2 + 1,0	0	0	50	0	0	0	0
0,5 + 0,5 + 0,2 + 1,0	0	0	1000	10	300	0	0
0,25 + 0,75 + 0,2 + 1,0	ca. 100	0	10 000	ca. 100	500	ca. 5 000	0
0,1 + 0,9 + 0,2 + 1,0	"	50	"	"	"	"	ca. 100

4. Kontrollen.

a) Komplementkontrollen:

Fr. Kompl. ( $\frac{1}{10}$ ) + NaCl + Bakt. + I.-Ser. $\frac{1}{100}$	Resultat I	Resultat II	Resultat III	Resultat IV	Resultat V	Resultat VI	Resultat VII
$\frac{1}{10}$ + 0 + 0,2 + 1,0	0	0	50	10	0	0	0 Kol.
0,5 + 0,5 + 0,2 + 1,0	0	0	1000	20	200	0	0
0,25 + 0,75 + 0,2 + 1,0	ca. 300	0	10 000	ca. 500	300	ca. 500	0
0,1 + 0,9 + 0,2 + 1,0	"	20	"	"	"	"	ca. 50





aus dem Reichsgesundheitsamt stammendes bakterizides Choleraimmunserum (Titer 1 : 5000). Die Plattenversuche, zu denen regelmäßig der gesamte Inhalt der Röhrchen verwendet wurde, sind stets nach 4-stündigem Aufenthalt derselben im Brutschrank bei 37 ° vorgenommen worden. Die Besichtigung der Agarplatten geschah nach 18—20-stündiger Bebrütung bei 37 °.

### I a.

Bei der Salzsäuretrennungsmethode wurde frisches Meer-schweinchenkomplement mit salzsäurehaltigem Aqu. dest. steril. gefällt. Auf 1 ccm Serum wurden 8,2 ccm  $N_{/250}$  bzw.  $N_{/275}$  bzw.  $N_{/300}$  Salzsäure hinzugefügt, 1 Stunde bei Zimmer-temperatur vor Licht geschützt aufbewahrt und dann scharf zentrifugiert. Der Niederschlag wurde nach erfolgter Waschung mit sterilem destilliertem Wasser auf 1 ccm aufgefüllt. Zur Neutralisation des Abgusses diente 0,8 ccm von  $1/25$  (bzw.  $1/27.5$ ,  $1/30$ ) n.NaOH (in 10-proz. phys. Kochsalzlösung).

Die Resultate von je 2 Trennungsversuchen mit  $N_{/250}$ , je 2 mit  $N_{/300}$  und 1 mit  $N_{/275}$  Salzsäure finden sich auf der vorstehenden Tabelle I (p. 242/43) verzeichnet. Die hämolytischen Trennungskontrollversuche wurden bei allen bakteriziden Trennungsversuchen, wie aus der Tabelle ersichtlich, stets mitangestellt.

Wie aus den Versuchen hervorgeht, gelang die Trennung des Komplements in Mittelstück und Endstück ziemlich gleichmäßig gut mit der Salzsäuremethode in den von Sachs und Altmann angegebenen Konzentrationen. Dabei lehren die Versuche I und II, daß auch mit  $N_{/250}$  Salzsäure eine immerhin ganz deutliche Spaltung zu erreichen ist, wenn auch, wie Braun schon bemerkt und wie auch aus diesen Versuchen (besonders IV) hervorgeht, die Trennung vielleicht besser gelingt, wenn die Salzsäure in geringerer Konzentration verwendet wird.

Alle Versuchsergebnisse zeigten deutlich — entgegen den früheren Ergebnissen von Liefmann und Stutzer und in Uebereinstimmung mit Braun —, daß Bau und Wirkungsweise des bakteriziden und hämolytischen Komplements ganz

gleich sind. Stets zeigte sich das Mittelstück und das Endstück allein im Verein mit dem Ambozeptor wirkungslos, während die Wirkung nach Wiedervereinigung der beiden Komponenten auf das deutlichste zutage tritt. Nur bei Verwendung größerer Mengen, besonders des Endstücks, trat — wie dies auch Braun beobachtete — eine wachstumshemmende Wirkung der betreffenden Komponente hervor, die aber, wie bekannt, und wie auch die Kontrollen zeigen, im hämolytischen Versuch oftmals ihr Analogon fanden.

## I b.

Außer durch Salzsäure ist bekanntlich die Spaltung des Komplements noch ausgeführt mittelst der Dialyse- und der Kohlensäuremethode (Liefmann). Mit der ersteren steril zu arbeiten, wie es der bakterizide Plattenversuch ja im höchsten Maße verlangt, erscheint ausgeschlossen. Die Kohlensäuremethode jedoch zeigte sich auch zur Spaltung des bakteriziden Komplements gut geeignet, da sich bei Einleitung derselben die Sterilität ohne weitere Schwierigkeiten wahren läßt. In eine Mischung von 1 ccm Serum + 4 ccm eiskaltem sterilen destillierten Wasser wurde 6—8 Minuten lang der Kohlensäurestrom aus einer Bombe eingeleitet und demnach scharf zentrifugiert. Der Abguß wurde mit 10-proz. physiologischer NaCl-Lösung isotonisch gemacht und das Sediment gewaschen und auf das Ursprungsvolumen mit Aqua destillata wieder aufgefüllt. Von den zahlreichen angestellten Versuchen sind zwei vorher angeführt (s. Tabelle I, p. 242/43, No. VI und VII). Sie zeigen, daß auch bei der CO<sub>2</sub>-Trennung das bakterizide Komplement dem hämolytischen völlig entspricht. Bei der ziemlich gleichmäßig gelungenen Trennung zeigt weder das Mittelstück noch das Endstück im Verein mit dem Ambozeptor irgendwie bakterizide Wirkung, die aber sofort nach Vereinigung der beiden künstlich getrennten Serumbestandteile sehr deutlich wird. Welche Art der Trennung man anwendet, ist für die Beschaffenheit der Einzelkomponenten irrelevant. Man kann, wie sich feststellen ließ, HCl-Mittelstück und CO<sub>2</sub>-Endstück und umgekehrt zur vollen Wirksamkeit wieder vereinigen.

## Ic.

Braun richtete seine Aufmerksamkeit auch auf das Verhalten der sogenannten Brandschen Modifikation, d. h. des in Kochsalz aufbewahrten und dabei veränderten Mittelstücks bei der Bakterizidie. Analog den Verhältnissen bei der Hämolyse konnte er feststellen, daß auch im bakteriziden Versuch das in NaCl-Lösung aufbewahrte Mittelstück sich bei gleichzeitigem Endstückzusatz nicht zur Wirksamkeit restituieren läßt. In einer anderen Beziehung aber zeigte sich ein grundsätzlicher Gegensatz. Während bekanntlich die komplettierende Funktion der Brandschen Modifikation das Mittelstück im hämolytischen Versuch bei späterem Endstückzusatz sich restituieren läßt, konnte diese Tatsache im bakteriziden Versuch nicht bestätigt werden, wofür Braun den Grund in der Natur des Antigens sieht. Bei einer Nachprüfung dieser interessanten Verhältnisse findet man nun, daß der Gegensatz nur ein scheinbarer ist. Denn wie aus nachstehenden Versuchen hervorgeht, kommt hierbei sehr in Betracht die Größe der Einsaat. Bei kleiner Einsaat läßt sich auch im bakteriziden Versuch die Restitution der Wirkung verdeutlichen, während dies bei großer Einsaat nicht gelingt.

## Die Wirksamkeit der Brandschen Modifikation:

E und M: 24 Stunden in Aqu. dest. getrennt aufbewahrt.

NaCl—M: 24 Std. in phys. NaCl-Lösung aufbewahrtes Mittelstück.

In M + E ist M : E = 1 : 10.

Im Vorversuch ergab sich die Unwirksamkeit von M bzw. E allein mit Ambozeptor.

I. M + E + NaCl + $\frac{1}{500}$ Bakt. + Immunsrum						Resultat I	Resultat II	
1,0	+	0	+	0,2	+	1,0	ca. 20	0
0,5	+	0,5	+	0,2	+	1,0	„ 500	0
0,25	+	0,75	+	0,2	+	1,0	„ 10 000	ca. 500
0,1	+	0,9	+	0,2	+	1,0	„ 100 000	„ 5000
M + E + NaCl + $\frac{1}{50}$ Bakt. + Immunsrum						Resultat I	Resultat II	
1,0	+	0	+	0,2	+	1,0	ca. 500	2—300
0,5	+	0,5	+	0,2	+	1,0	„ 10 000	einige 1000
0,25	+	0,75	+	0,2	+	1,0	„ 100 000	ca. 10 000
0,1	+	0,9	+	0,2	+	1,0	∞	fast ∞
II. NaCl—M + E + NaCl + $\frac{1}{500}$ Bakt. + Immunsrum						Resultat I	Resultat II	
1,0	+	0	+	0,2	+	1,0	∞	ca. 10 000
0,5	+	0,5	+	0,2	+	1,0	∞	„ 100 000
0,25	+	0,75	+	0,2	+	1,0	∞	∞
0,1	+	0,9	+	0,2	+	1,0	∞	∞

III. NaCl — M + NaCl + $\frac{1}{500}$ Bakt. + I.-S. + n. $\frac{1}{2}$ E									
0,2	+	0	+	0,2	+	1,0	+	1,0	Resultat I
0,1	+	0,5	+	0,2	+	1,0	+	0,5	ca. 1 000
0,05	+	0,75	+	0,2	+	1,0	+	0,25	„ 10 000
0,02	+	0,9	+	0,2	+	1,0	+	0,1	„ 100 000
									„ 5000
IV. NaCl — M + NaCl + $\frac{1}{50}$ Bakt. + I.-S. + n. $\frac{1}{2}$ E									
0,2	+	0	+	0,2	+	1,0	+	1,0	ca. 100 000
0,1	+	0,5	+	0,2	+	1,0	+	0,5	ca. 10 000
0,05	+	0,75	+	0,2	+	1,0	+	0,25	„ 100 000
0,02	+	0,9	+	0,2	+	1,0	+	0,1	„ 5000
V. Einsaatkontrolle:									
2,0	NaCl	+	0,2	Bakt.	$\frac{1}{500}$	sofort	ca. 1000	ca. 300	
2,0	„	+	0,2	„	$\frac{1}{500}$	n. 4 <sup>h</sup>	„	fast „	
2,0	„	+	0,2	„	$\frac{1}{50}$	sofort	mehrere 1000	ca. 10 000	
2,0	„	+	0,2	„	$\frac{1}{50}$	n. 4 <sup>h</sup>	„	„	
VI. Hämolytische Kontrollen:									
a) M + E + NaCl + Hbl. + Abz.					Resultat I		Resultat II		
0,5	+	0,5	+	1,0 + 0,15	komplett		komplett		
0,25	+	0,75	+	1,0 + 0,15	fast komplett		fast komplett		
0,1	+	0,9	+	1,0 + 0,15	deutlich		deutlich		
b) NaCl—M + E + NaCl + Hbl. + Abz.					Resultat I		Resultat II		
0,5	+	0,5	+	1,0 + 0,15	Spürchen		0		
0,25	+	0,75	+	1,0 + 0,15	0		0		
0,1	+	0,9	+	1,0 + 0,15	0		0		
c) NaCl—M + NaCl + Hbl. + Abz. + n. $\frac{1}{2}$ E.					Resultat I		Resultat II		
0,1	+	0,5	+	1,0 + 0,15 + 0,5	komplett		komplett		
0,05	+	0,75	+	1,0 + 0,15 + 0,25	komplett		fast komplett		
0,02	+	0,9	+	1,0 + 0,15 + 0,1	fast kompl.		deutlich		

Es dürfte demnach auch bezüglich der Wirkungsart der Brandschen Modifikation des Mittelstücks ebenso wie in den anderen vorbesprochenen Verhältnissen eine völlige Uebereinstimmung zwischen dem bakteriziden und dem hämolytischen Komplement anzunehmen sein.

## II.

Durch die Untersuchungen von Sachs und Teruuchi betr. die Inaktivierung der Komplemente im salzfreien Medium hatte sich zeigen lassen, daß frisches Meerschweinchenserum durch Verdünnen mit etwa 8—9 Teilen Wasser bei 37° derart verändert wird, daß es nach dem Besalzen Komplementwirkung nicht mehr ausübt. Es lag nahe, zu prüfen, ob diese für die Hämolyse gefundenen Resultate auch für das bakterizide Komplement Gültigkeit haben. Die Versuchsanordnung war so, daß 1,0 ccm frisches Meerschweinchenserum + 8,2 steriles Leitungswasser  $1\frac{1}{4}$  Stunde bei 37° im Dunkeln aufbewahrt wurde. Danach Besalzen durch 0,8 ccm 10-proz.

NaCl-Lösung. Zur Kontrolle 10 ccm  $\frac{1}{10}$  Meerschweinchenkomplement (in 0,85-proz. NaCl-Lösung) ebenfalls  $1\frac{1}{4}$  Stunde bei  $37^{\circ}$  gehalten. Von mehreren Versuchen seien zwei nachstehend angeführt.

						Hämolyse quantitativ entsprechend	
NaCl + $\frac{1}{100}$ I.-S. + Bakt. + H <sub>2</sub> O Kompl.	Resultat I	Resultat II	bei I	bei II			
0,5 + 0,5 + 0,2 + 0,5	ca. 1 000	ca. 20 000	f. kmpl.	Spürch.			
0,75 + 0,5 + 0,2 + 0,25	" 10 000	" 100 000	Spur	0			
0,9 + 0,5 + 0,2 + 0,1	" 100 000	fast ∞	Spürch.	0			
0,95 + 0,5 + 0,2 + 0,05	mehrere 100 000	∞	0	0			
NaCl + $\frac{1}{100}$ I.-S. + Bakt. + NaCl-Kompl.							
0,5 + 0,5 + 0,2 + 0,5	0	ca. 1 000	komplett	komplett			
0,75 + 0,5 + 0,2 + 0,25	ca. 100	" 5 000	f. kmpl.	f. kmpl.			
0,9 + 0,5 + 0,2 + 0,1	" 500	" 50 000	f. kmpl.	deutlich			
0,95 + 0,5 + 0,2 + 0,05	" 1000	" 100 000	"	Spur			
Einsaat 0,2 Bakt. $\frac{1}{500}$ sofort	ca. 500	ca. 5000					
0,2 " $\frac{1}{500}$ n. 4 <sup>h</sup>	fast ∞	∞					

Wie die Ergebnisse zeigen erleidet also auch das bakterizide Komplement im salzfreien Medium eine ganz bedeutende Einbuße in seiner Wirksamkeit.

Es fragte sich nun weiter, ob auch die von Sachs und Bolkowska beim Versuch der Restitution des Wasser-Komplements durch Mittelstück oder Endstück bei der Hämolyse gefundenen Verhältnisse beim bakteriziden Komplement sich bestätigen ließen. Bekanntlich erzielten die Autoren wechselnde Ergebnisse, indem nämlich die Restitution des im salzfreien Medium zerstörten Komplements vielfach durch isolierten Zusatz von Endstück, in selteneren Fällen aber auch durch Mittelstückzusatz gelang. Tatsächlich zeigte sich diese Regellosigkeit auch im bakteriziden Versuch. Auch hier schien Endstückzusatz zur Wiederherstellung der Wirkung des in Wasser zerstörten Komplements geeigneter. Aber auch bei alleinigem Mittelstückzusatz war eine komplettierende Wirkung bisweilen immerhin zu erkennen. In einem Versuch gelang es, genau wie dies Sachs und Bolkowska bei der Hämolyse gefunden, das durch Wasserverdünnung erheblich abgeschwächte Komplement sowohl durch Mittelstück als durch Endstück deutlich zu verstärken, wenn auch eine vollkommene Wiederherstellung der Komplementwirkung dabei nicht ein-

trat, wie dies die Autoren beim hämolytischen Komplement beobachteten.

### III.

Eine letzte Serie von Versuchen betraf die Beeinflussung des bakteriziden Komplements durch das Cobragift. Flexner und Noguchi, Noc, Sachs, Morgenroth und Kaya haben festgestellt, daß die Einwirkung des Cobragiftes die Komplementwirkung aufhebt. Beim bakteriziden Komplement ist, wie der folgende Versuch in Bestätigung der Angaben von Flexner und Noguchi, sowie Noc zeigt, das gleiche der Fall.

Betreffs der Versuchsanordnung sei bemerkt, daß nach den Angaben von Omorokoff 1,0 ccm frisches Meerschweinchenserum + 0,4  $\frac{1}{100}$ -proz. Cobragift  $\frac{1}{4}$  Stunde bei 37° gehalten und danach 8,6 ccm physiologischer NaCl-Lösung hinzugefügt wurde. Wenn auch an sich steril, so wurde das Gift sicherheitshalber noch 30 Minuten der Besonnung in dünnster Schicht ausgesetzt. Eine Beeinträchtigung in seiner Wirkung erfuhr es dadurch nicht, wie entsprechende Versuche zeigten:

NaCl + $\frac{1}{100}$	I.-Ser.	+ Bakt.	+ Cobrag.-Kompl.	Resultat	
0	+	0,5	+ 0,2	+ 1,0	mehrere 1000 Kolonien
0,5	+	0,5	+ 0,2	+ 0,5	∞ Kolonien
0,75	+	0,5	+ 0,2	+ 0,25	∞ "
0,9	+	0,5	+ 0,2	+ 0,1	∞ "
NaCl + $\frac{1}{100}$	I.-Ser.	+ Bakt.	+ $\frac{1}{10}$ Meersch.-Kompl.	Resultat	
0	+	0,5	+ 0,2	+ 1,0	0 Kolonien
0,5	+	0,5	+ 0,2	+ 0,5	10 "
0,75	+	0,5	+ 0,2	+ 0,25	ca. 100 "
0,9	+	0,5	+ 0,2	+ 0,1	" 300 "

Von Kontrollen sei erwähnt:

Einsaat 0,2  $\frac{1}{500}$  Bakt. + 1,0 NaCl sofort ca. 5000 Kolonien  
 „ 0,2  $\frac{1}{500}$  „ + 1,0 „ n. 4 Std. ∞ „

Hämolytische Kontrolle:

NaCl + Hbl. + Abz. $\frac{1}{100}$	Cobrag.-Kompl.	Resultat
0 + 0,5 + 0,15	+ 1,0	Spürchen
0,5 + 0,5 + 0,15	+ 0,5	0
0,75 + 0,5 + 0,15	+ 0,25	0
0,9 + 0,5 + 0,15	+ 0,1	0
NaCl + Hbl. + Abz. $\frac{1}{100}$	fr. Meersch.-Kompl.	
0 + 0,5 + 0,15	+ 1,0	komplett
0,5 + 0,5 + 0,15	+ 0,5	„
0,75 + 0,5 + 0,15	+ 0,25	fast komplett
0,9 + 0,5 + 0,15	+ 0,1	deutlich

Es fragte sich nun, ob in bezug auf die Restitution des mit Cobragift behandelten bakteriziden Komplements die gleichen Verhältnisse bestehen, wie sie kürzlich von Braun,

Sachs und Omorokoff für das hämolytische Komplement beschrieben wurden. Es gelingt nämlich, das durch Cobragift inaktivierte, hämolytische Komplement besonders durch Zusatz von Mittelstück, wie schon Braun zeigte, in der Regel aber auch durch Endstück, wie sich aus den Untersuchungen von Sachs und Omorokoff ergibt, in seiner Wirkung zu restituieren. Daß auch für das bakterizide Komplement im Prinzip gleichartige Verhältnisse bestehen, zeigt der folgende Versuch:

NaCl + I.-Ser. + Bakt. + Cobrag.-Kompl.							+ M. bzw. + E.				
0	+	0,5	+	0,2	+	1,0	0	0,1	ca. 100	0,5	ca. 1 000
0,5	+	0,5	+	0,2	+	0,5	0	0,1	"	300	0,5 " 3 000
0,75	+	0,5	+	0,2	+	0,25	0	0,1	"	300	0,5 " 10 000
0,9	+	0,5	+	0,2	+	0,1	0	0,1	"	500	0,5 fast ~
1,0	+	0,5	+	0,2	+	0	0	0,1	"	~	0,5 ~
NaCl + I.-Ser. + Bakt. + <sup>1</sup> / <sub>10</sub> Mschw.-Kompl.											
0	+	0,5	+	0,2	+	1,0	0	Einsaatkontrolle			
0,5	+	0,5	+	0,2	+	0,5	0	0,2 Bakt. + 1,0 NaCl sofort			
								ca. 1000			
0,75	+	0,5	+	0,2	+	0,25	0	0,2 Bakt. + 1,0 NaCl n. 4			
0,9	+	0,5	+	0,2	+	0,1	ca. 50	Std. ~			

#### Hämolytische Kontrollen:

NaCl + Hbl. + $\frac{1}{100}$ Abz. + Cobrag.-Kompl.						+ M 0,1		+ E. 0,5	
0	+	1,0	+	0,15	+	1,0	0	komplett	deutlich
0,5	+	1,0	+	0,15	+	0,5	0	„	Spur
0,75	+	1,0	+	0,15	+	0,25	0	fast komplett	Spürchen
0,9	+	1,0	+	0,15	+	0,1	0	deutlich	0
NaCl + Hbl. + Abz. + $\frac{1}{10}$ Komplement									
0	+	1,0	+	0,15	+	1,0	komplett		
0,5	+	1,0	+	0,15	+	0,5	„		
0,75	+	1,0	+	0,15	+	0,25	fast komplett		
0,9	+	1,0	+	0,15	+	0,1	deutlich		

M. bzw. E. isoliert mit dem System = 0.

Die Restitution der Wirkung des durch Cobragift inaktiv gewordenen Komplements ist also sowohl durch Mittelstück, als auch durch Endstück eine deutliche, stärker bei Mittelstückzusatz. Allerdings ist eine quantitative Restitution, wie sie Sachs und Omorokoff für das hämolytische Komplement beschreiben, nicht erzielt worden. Aber auch in den Kontrollversuchen ist, wenigstens durch Endstückzusatz, die volle Wirkung des hämolytischen Komplements nicht erreicht worden. Offenbar sind hierfür geringe Abweichungen in den Versuchsbedingungen verantwortlich zu machen, und es dürften daher weitere Untersuchungen notwendig sein,



um das Verhalten des bakteriziden Komplements gegenüber der Cobragiftwirkung aufzuklären. Prinzipiell scheinen jedenfalls nach meinen bisherigen Erfahrungen ganz ähnliche Verhältnisse vorzuliegen, wie bei dem hämolytischen Komplement.

### Zusammenfassung.

1) Das bakterizide Komplement entspricht im Bau dem hämolytischen. Die bakterizide Komplementwirkung zeigt sich als die Resultante der Funktionen zweier Serumbestandteile, von denen einer in der Globulinfraction, der andere im Serumabguß sich nachweisen läßt.

2) Diese Uebereinstimmung erstreckt sich auch auf die Wirkungsart der Brandschen Modifikation des Mittelstücks.

3) Das bakterizide Komplement erleidet ebenso wie das hämolytische im salzfreien Medium eine starke Abschwächung seiner Wirkung, die zuweilen durch Mittelstück-, zuweilen durch Endstückzusatz, gelegentlich durch beide Fraktionen ziemlich wiederhergestellt werden kann.

4) Durch Cobragift wird die bakterizide Komplementwirkung aufgehoben, deren Restitution durch Endstück- wie durch Mittelstückzusatz, vollständiger durch letzteres gelingt.

### Literatur.

- Liefmann und Stutzer, Berliner klin. Wochenschr., 1910.  
 Liefmann, Berliner klin. Wochenschr., 1908.  
 Sachs und Altmann, in Kraus-Levaditi, Handbuch der Technik und Methodik der Immunitätsforschung.  
 Sachs und Teruuchi, Berliner klin. Wochenschr., 1907.  
 -- und Bolkowska, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 7, 1910.  
 -- und Omorokoff, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 11, 1911.  
 Braun, H., Biochem. Zeitschr., Bd. 31, 1911, Heft 1 und 2.  
 -- Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 9, 1911.  
 Ferrata, Berliner klin. Wochenschr., 1907, No. 34.  
 Brand, Berliner klin. Wochenschr., 1907, No. 34.  
 Hecker, Arb. a. d. Institut f. exper. Therapie, 1907, Heft 3.  
 Liefmann, Centralbl. f. Bakt., Ref., Bd. 50, Beilage, 1911, p. 149.  
 Flexner und Noguchi, Med. Bulletin, Nov. 1902.  
 -- -- Journ. of exper. med., Vol. 6, 1902, No. 3.  
 Noc, Annal. de l'Institut Pasteur, T. 19, 1905.  
 Morgenroth und Kaya, Biochem. Zeitschr., Bd. 8, 1908, p. 378.

*Nachdruck verboten.*

[Aus dem Institut für Hygiene und experimentelle Therapie zu Marburg (Direktor: Wirkl. Geh. Rat Prof. Dr. v. Behring).]

### Weiterer Beitrag zur Frage der Haltbarkeit heterologen Antitoxins im Organismus.

Von Professor Dr. Paul H. Römer, Marburg.

(Eingegangen bei der Redaktion am 16. Februar 1912.)

In einer früheren, gemeinsam mit Sames publizierten Arbeit<sup>1)</sup> konnte gezeigt werden, daß im Blute von Schafen, die auf die verschiedenste Weise (subkutane Injektion, direkte und indirekte Fütterung) mit tetanusantitoxinhaltigem Pferdeserum behandelt waren, sich das Antitoxin bis zu 6 Monaten halten kann; in einem Fall allerdings (Schaf 51, s. p. 278 der zitierten Arbeit) war das subkutan eingespritzte Tetanusantitoxin in spätestens 8 Wochen vollkommen ausgeschieden. Da gerade dieser Fall ein ausgewachsenes Schaf betraf, die erstgenannten Fälle aber neugeborene bzw. sehr junge Lämmer, habe ich ad hoc an einem älteren Schaf den Versuch noch einmal wiederholt.

**Versuch 1.** Schaf 91, Gewicht 35 kg, erhielt am 16. VIII. 09 26,5 ccm Tetanusserum (insgesamt 132,5 A.E.) subkutan injiziert. Vor der Tetanusseruminjektion, sowie 2, 10, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180 und 210 Tage nach der Serumeinspritzung wurden Blutproben entnommen und auf Antitoxin geprüft.

Zu den Antitoxinprüfungen diente dasselbe Gift, das wir in der früheren Arbeit<sup>1)</sup> benutzt hatten und für das wir folgende Werte feststellten: 1 ccm = 120 000 + Ms (d. h. tödliche Dosis für 120 000 g Maus bzw. 0,0001 tödliche Minimaldosis für eine Maus von 12 g). Indirekte Giftprüfungen ergaben die gleichen Werte wie früher, d. h.

0,008	ccm Gift	+ $\frac{1}{1000}$	A.E.	} = L† (Tod der Maus frühestens nach 4–5 Tagen).
0,004	„	„	+ $\frac{1}{2000}$	
0,003	„	„	+ $\frac{1}{3500}$	
0,002	„	„	+ $\frac{1}{5000}$	
0,001	„	„	+ $\frac{1}{4000}$	
0,0007	„	„	+ $\frac{1}{6500}$	
0,0003	„	„	+ $\frac{1}{10000}$	

1) Diese Zeitschrift, Bd. 4, 1909, Heft 3.

Entsprechend diesen Neutralisierungsformeln sind die nachfolgenden Antitoxinberechnungen vorgenommen worden.

Tabelle I.

Serum- prüfung vom	Maus No.	Ge- wicht g	Gift- dosis	Serumdosis ccm	Ergebnis	1 ccm des Schaf- serums ent- hielt also
16. VIII. 09 vor der Serum- injektion	6951	12	0,0001	0,3 Serum Schaf 91	+ nach 5 Tag.	0 A.E.
	6950	12	0,0001	0,3 Norm.-Schafser.	+ n. 4 1/2 Tag.	
18. VIII. 09	6952	12	0,008	1/200 Serum Schaf 91	+ nach 28 Std.	1/17 A.E.
	6953	12	"	1/150 " " "	+ " 36 "	
	6954	12	"	1/80 " " "	+ " 42 "	
	6955	12	"	1/40 " " "	glatt	
26. VIII. 09	7038	10	0,008	1/40 Serum Schaf 91	+ nach 27 Std.	1/33 A.E.
	7073	11,5	"	1/30 " " "	+ " 4 1/2 Tag.	
	7071	13	"	1/15 " " "	glatt	
	7039	10	"	1/5 " " "	"	
31. VIII. 09	7128	11	0,008	1/30 Serum Schaf 91	+ nach 48 Std.	ca. 1/60 A.E.
	7072	13	"	1/15 " " "	glatt	
14. IX. 09	7129	11	0,008	1/15 Serum Schaf 91	+ nach 23 Std.	ca. 1/800 A.E.
	7214	10	"	1/10 " " "	+ " 26 "	
	7215	13	"	1/5 " " "	+ " 42 "	
	7216	13	"	1/2 " " "	glatt	
14. X. 09	7257	13	0,008	1/2 Serum Schaf 91	+ nach 36 Std.	ca. 1/660 A.E.
	7295	14	0,004	0,3 " " "	glatt	
14. XI. 09	7354	13	0,002	0,3 Serum Schaf 91	+ nach 5 Tag.	1/1000 A.E.
14. XII. 09	7377	14	0,0007	0,3 Serum Schaf 91	+ nach 5 Tag.	1/3000 A.E.
14. I. 10	7391	13,5	0,0002	0,3 Serum Schaf 91	=====	geringe Mengen von Antitoxin
	7389	13	0,0001	0,3 " " "	=====	
	7388	13,5	0,0002	0,3 Norm.-Schafser.	+ nach 48 Std.	
	7390	13	0,0001	0,3 dgl.	+ " 4 1/2 Tag.	
14. II. 10	7393	12,5	0,0002	0,3 Serum Schaf 91	+ nach 4 Tag.	Spuren von Antitoxin
	7392	12,5	0,0001	0,3 " " "	=====	
	7394	12,5	0,0002	0,3 Norm.-Schafser.	+ nach 48 Std.	
	7395	12,5	0,0001	0,3 dgl.	+ " 5 Tag.	
14. III.	7515	12,5	0,0001	0,3 Serum Schaf 91	=====	0 A.E.
	7516	12,5	0,0001	0,3 Norm.-Schafser.	=====	

Es vermag also das einem heterologen (Pferde-)Blutserum entstammende Antitoxin sich im Organismus auch erwachsener Schafe bis zu 6 Monaten in nachweisbaren Mengen zu halten.

Uebrigens war dieses Schaf 91 — im Gegensatz zu zahlreichen anderen — das einzige, in dessen Blutserum sich auch die mit einem präzipitierenden Pferdeantiserum nachweisbare präzipitable Substanz sehr lange hielt (vgl. die nachfolgende Arbeit).

Ich habe sodann meine Untersuchungen auch auf Diphtherieantitoxin ausgedehnt, um festzustellen, ob etwa prinzipielle Unterschiede zwischen Diphtherieantitoxin und Tetanusantitoxin bestünden.

Zur Prüfung diene das in mehreren früheren Arbeiten<sup>1)</sup> schon genauer beschriebene und in großen Mengen von uns vorrätig gehaltene und dauernd kontrollierte Diphtheriegift Ballon 7. Die Prüfung geschah nach der von mir angegebenen und auch bereits von anderen Autoren (Karasawa und Schick) mit Erfolg benutzten intrakutanen Wertbestimmungsmethode. Dieselbe besteht darin, daß fallende Dosen des zu prüfenden Serums mit den mit Hilfe der Frankfurter Test-Antitoxin-Einheit festgestellten Testgift Dosen gemischt und die Mischungen in meist 0,1 ccm Gesamtflüssigkeit normalen Meerschweinchen intrakutan in depilierte Hautstellen injiziert werden. Es wurden in der Regel 4 bis höchstens 6 Prüfungen gleichzeitig an einem Tier vorgenommen und der Erfolg der Injektion nach  $2 \times 24$ ,  $3 \times 24$ ,  $5 \times 24$  und  $8 \times 24$  Stunden kontrolliert und eingetragen. Als Grenzwert diene der schon früher von uns benutzte Ln-Wert (Limes-Nekrose-Wert), d. h. Feststellung derjenigen Serumdosis, die noch eben mit der entsprechenden Testgift Dosis eine Spur Nekrose erzeugte. Die Neutralisierungsformeln für das Diphtheriegift Ballon 7 lauten:

$$\left. \begin{array}{llll} \frac{1}{10} & \text{Diphtherie-A.E.} & + 0,008 & \text{Diphtheriegift Ballon 7} \\ \frac{1}{50} & \text{,,} & + 0,002 & \text{,,} \\ \frac{1}{2000} & \text{,,} & + 0,000125 & \text{,,} \\ \frac{1}{40000} & \text{,,} & + 0,00002 & \text{,,} \end{array} \right\} = \text{Ln.}$$

Ohne Antitoxin erzeugte noch gerade die Dosis von 0,00001 ccm des Diphtheriegiftes deutliche Nekrose.

Entsprechend diesen Neutralisierungsformeln sind die nachfolgend angeführten Antitoxinberechnungen vorgenommen worden. Die Schafsera wurden nur inaktiviert ( $\frac{1}{2}$  Stunde auf  $56^{\circ}$  erwärmt) verwandt, um die häufig normalerweise vorhandene, Hautentzündungen hervorrufende Wirkung frischen Schafserums zu verhindern.

**Versuch 2.** Schaf 59, 45 kg schwer, erhält am 8. XI. 10 10 ccm des Diphtherieserums Flasche 1 (1350-fach) = 13500 D.A.E. subkutan. Antitoxinprüfungen des Blutes wurden nach 2, 9 und 16 Tagen vorgenommen mit dem in Tabelle II verzeichneten Ergebnis.

1) Diese Zeitschrift, Bd. 3, H. 2, 4 und 5.

Tabelle II.

Serum- prüfung vom	Meer- schw. No.	Ge- wicht g	Gift- dosis	Serumdosis ccm	Ergebnis	1 ccm des Schaf- serums ent- hält also
10. XI. 10	9029	220	0,000125	$\frac{1}{1000}$ Ser. Schaf 59	starke Nekrose	} $\frac{1}{16}$ A.E.
			"	$\frac{1}{750}$ " " "	mäßige "	
			"	$\frac{1}{175}$ " " "	Spur	
			"	$\frac{1}{65}$ " " "	glatt	
19. XI. 10	9059	300	0,000125	$\frac{1}{40}$ Serum Schaf 59	starke Nekrose	} $\frac{1}{1000}$ A.E.
			"	$\frac{1}{20}$ " " "	" "	
			"	$\frac{1}{10}$ " " "	" "	
			"	$\frac{1}{5}$ " " "	" "	
	9067	250	0,00002	$\frac{1}{80}$ " " 59	geringe Nekr.	
			"	$\frac{1}{40}$ " " "	Spur	
			"	$\frac{1}{20}$ " " "	glatt	} 0 A.E.
			"	$\frac{1}{10}$ " " "	"	
26. XI. 10	9080	250	0,00002	$\frac{1}{20}$ Serum Schaf 59	Nekrose	} 0 A.E.
			"	$\frac{1}{10}$ " " "	"	

Bereits 18 Tage nach der Seruminjektion war also kein nachweisbares Diphtherieantitoxin mehr im Blute vorhanden.

Versuch 3. Schaf 58, 46 kg schwer, erhält am 26. XI. 10 13 ccm Diphtherieserum II (360-fach) = 4600 D.A.E. subkutan. Das Blutserum wurde in der gleichen Weise wie das des Schafes 59 2 Tage und 11 Tage nach der Seruminjektion geprüft mit nachfolgendem Ergebnis:

Tabelle III.

Serum- Prüfung vom	Meer- schw. No.	Ge- wicht g	Gift- dosis	Serumdosis ccm	Ergebnis	1 ccm des Schaf- serums ent- hält also
28. XII. 10	9088	250	0,000125	$\frac{1}{4000}$ Ser. Schaf 58	Nekrose	} $\frac{1}{2}$ A.E.
			"	$\frac{1}{2000}$ " " "	" "	
			"	$\frac{1}{1000}$ " " "	Spur Nekrose	
			"	$\frac{1}{500}$ " " "	glatt	
	9081	220	0,000125	$\frac{1}{500}$ " " 58	glatt	
			"	$\frac{1}{250}$ " " "	" "	
			"	$\frac{1}{125}$ " " "	" "	
			"	$\frac{1}{62}$ " " "	" "	
			"	$\frac{1}{30}$ " " "	" "	} 0 A.E.
			"	$\frac{1}{10}$ " " "	"	
8. XII. 10	9110	200	0,00002	$\frac{1}{40}$ Serum Schaf 58	Nekrose	} 0 A.E.
			"	$\frac{1}{20}$ " " "	"	
			"	$\frac{1}{10}$ " " "	"	
			"	phys. Kochsalzlös.	"	

Bei Schaf 58 war also bereits 11 Tage nach der Antitoxininjektion das eingespritzte Antitoxin nicht mehr nachweisbar, obwohl 2 Tage nach der Serumeinspritzung sich relativ viel beträchtlichere Mengen fanden, als bei dem Schaf 58.

Versuch 4. Schaf 33, 50 kg schwer, erhält am 26. XI. 10 14 ccm des Diphtherie-Heilserums II (360-fach) = 5000 D.A.E. subkutan. Das Blutserum wurde in der gleichen Weise wie oben geprüft, und zwar 2 Tage und 11 Tage nach der Serumeinspritzung mit nachfolgendem Ergebnis:

Tabelle IV.

Serum- prüfung vom	Meer- schw. No.	Ge- wicht g	Gift- dosis	Serumdosis ccm	Ergebnis	1 ccm des Schaf- serums ent- hält also
28. XI. 10	9091	240	0,00025	$\frac{1}{4000}$ Ser. Schaf 33	Nekrose	} $\frac{1}{4}$ A.E.
			"	$\frac{1}{2000}$ " " "	"	
			"	$\frac{1}{1000}$ " " "	"	
			"	$\frac{1}{500}$ " " "	Spur Nekrose	
	9082	310	0,00025	$\frac{1}{500}$ Serum Schaf 33	Spur Nekrose	
			"	$\frac{1}{250}$ " " "	glatt	} 0 A.E.
			"	$\frac{1}{125}$ " " "	"	
			"	$\frac{1}{62}$ " " "	"	
			"	$\frac{1}{20}$ " " "	"	
			"	$\frac{1}{10}$ " " "	"	
8. XII. 10	9112	200	0,00002	$\frac{1}{40}$ Serum Schaf 33	Nekrose	} 0 A.E.
			"	$\frac{1}{20}$ " " "	"	
			"	$\frac{1}{10}$ " " "	"	
			"	$\frac{1}{5}$ phys. Kochsalzlös.	"	

Auch in diesem Falle war das Diphtherieantitoxin bereits nach 11 Tagen ausgeschieden.

Auf Grund dieses Versuches mußte an die Möglichkeit gedacht werden, daß Diphtherieantitoxin bezüglich der Haltbarkeit im Schaforganismus vielleicht prinzipiell sich anders verhält, wie das ebenfalls vom Pferde stammende Tetanusantitoxin. Andererseits aber war zu berücksichtigen, daß zwei der oben angeführten Schafe (No. 33 und 58) bereits früher einmal mit Pferdeserum behandelt waren. Vielleicht war die raschere Ausscheidung des Diphtherieantitoxins auf diese frühere Pferdeseruminjektion und einen danach zurückgebliebenen Ueberempfindlichkeitszustand zu beziehen. Weiter war zu berücksichtigen, daß wir schon früher einmal (vgl. Bd. 4 dieser Zeitschr., p. 278) eine relativ rasche Ausscheidung

auch des Tetanusantitoxins bei einem Schafe gefunden hatten, das vorher nicht mit Pferdeserum behandelt war. Ferner zeigte sich — ich verzichte auf die Mitteilung der Einzelprotokolle — daß bei den erwähnten Schafen 33, 58 und 59 auch eingespritztes Tetanusantitoxin mit der gleichen Schnelligkeit ausgeschieden wurde. Endlich dürfte der nachfolgende Versuch beweisen, daß Diphtherieantitoxin sich im Prinzip nicht anders verhält wie Tetanusantitoxin, insofern als wir bei dem nachfolgend erwähnten Schafe 113 relativ langes Verbleiben des Diphtherieantitoxins im Blutserum feststellen konnten.

Versuch 5. Schaf 113, 49 kg schwer, erhält am 12. XII. 10 13,6 ccm des Diphtherieserums II (360-fach) = 4900 A.E. subkutan. Es wurden Blutproben des Schafes 2, 10, 18, 31 und 61 Tage nach der Seruminjektion geprüft. Die Technik der Prüfung war die gleiche wie bei den Serumprüfungen der Schafe 59, 58 und 33.

Tabelle V.

Serum- prüfung vom	Meer- schw. No.	Ge- wicht g	Gift- dosis	Serumdosis ccm	Ergebnis	1 ccm des Schafser. enthält also
14. XII. 10	9121	310	0,000125	$\frac{1}{4000}$ Ser. Schaf 113	Nekrose	} $\frac{1}{2}$ A.E.
			"	$\frac{1}{2000}$ " "	"	
			"	$\frac{1}{1000}$ " "	Spur Nekrose	
			"	$\frac{1}{500}$ " "	glatt	
			"	$\frac{1}{250}$ " "	"	
			"	$\frac{1}{125}$ " "	"	
22. XII. 10	9152	360	0,000125	$\frac{1}{2000}$ Ser. Schaf 113	Nekrose	} $\frac{1}{10}$ A.E.
			"	$\frac{1}{1000}$ " "	"	
			"	$\frac{1}{500}$ " "	Spur Nekrose	
			"	$\frac{1}{200}$ " "	Andeutung von Nekrose	
			"	$\frac{1}{100}$ " "	113 glatt	
	9148	370	0,000125	$\frac{1}{100}$ Ser. Schaf	glatt	} $\frac{1}{15}$ A.E.
			"	$\frac{1}{80}$ " "	"	
			"	$\frac{1}{40}$ " "	"	
			"	$\frac{1}{20}$ " "	"	
			"	$\frac{1}{10}$ " "	"	
30. XII. 10	9153	300	0,000125	$\frac{1}{2000}$ Ser. Schaf 113	Nekrose	} $\frac{1}{15}$ A.E.
			"	$\frac{1}{1000}$ " "	"	
			"	$\frac{1}{500}$ " "	"	
			"	$\frac{1}{200}$ " "	"	
			"	$\frac{1}{100}$ " "	glatt	
	9147	320	0,000125	$\frac{1}{160}$ Ser. Schaf 113	Spur Nekrose	} $\frac{1}{15}$ A.E.
			"	$\frac{1}{80}$ " "	glatt	
			"	$\frac{1}{40}$ " "	"	
			"	$\frac{1}{20}$ " "	"	
			"	$\frac{1}{10}$ " "	"	

Serum- prüfung vom	Meer- schw. No.	Ge- wicht g	Gift- dosis	Serumdosis ccm	Ergebnis	1 ccm des Schafser. enthält also
12. I. 11	9151	400	0,000125	$\frac{1}{70}$ Ser. Schaf 113	Nekrose	} $\frac{1}{40}$ A.E.
			" $\frac{1}{80}$	" " "	"	
			" $\frac{1}{50}$	" " "	Spur Nekrose	
			" $\frac{1}{40}$	" " "	glatt	
			" $\frac{1}{30}$	" " "	"	
			" $\frac{1}{20}$	" " "	"	
11. II. 11	9216	340	0,000125	$\frac{1}{50}$ Ser. Schaf 113	Nekrose	} $\frac{1}{360}$ A.E.
			" $\frac{1}{40}$	" " "	"	
			" $\frac{1}{30}$	" " "	"	
			" $\frac{1}{20}$	" " "	"	
			" $\frac{1}{10}$	" " "	Spur Nekrose	
			" $\frac{1}{5}$	" " "	glatt	
	9218	280	0,00004	$\frac{1}{80}$ Ser. Schaf 113	Spur Nekrose	} $\frac{1}{360}$ A.E.
			" $\frac{1}{40}$	" " "	glatt	
			" $\frac{1}{20}$	" " "	"	
			" $\frac{1}{10}$	" " "	"	
			" $\frac{1}{5}$	" " "	"	
			"	phys. Kochsalzlös.	Nekrose	

Leider konnte die weitere Antitoxinabnahme im Blut des Schafes 113 nicht mehr verfolgt werden. Vorstehender Versuch lehrt nur so viel, daß in diesem Falle sich das Diphtherie-Antitoxin in recht beträchtlichen Mengen bis zu mindestens 2 Monaten nach der Injektion gehalten hat. Ein prinzipieller Unterschied zwischen Diphtherieantitoxin und Tetanusantitoxin hinsichtlich ihres Verhaltens im Schaforganismus dürfte also kaum bestehen. Wenn wir in den spärlichen Untersuchungen über die Haltbarkeit von Diphtherieantitoxin im Schaforganismus häufiger rasches Verschwinden feststellten, während in nahezu allen Versuchen mit Tetanusantitoxin lange Haltbarkeit festgestellt wurde, so ist vermutlich zur Erklärung das oben erwähnte Moment heranzuziehen, daß zwei der mit Diphtherieantitoxin behandelten Schafe schon früher eine Pferdeseruminjektion erhalten hatten.

Im allgemeinen finden wir jedenfalls in diesen Untersuchungen eine Bestätigung unserer früheren Angabe, daß an Pferdeserum geknüpft Antitoxin sich im Blute von Schafen, die auf die verschiedenste Weise mit ihm behandelt sind, viel länger halten kann, als man es für gewöhn-



lich bei heterologen Antitoxinen erwartet. Diphtherieantitoxin und Tetanusantitoxin verhalten sich dabei im wesentlichen identisch; dagegen scheint die frühere Behandlung des Schafes mit Pferdeserum eine raschere Ausscheidung nachfolgend injizierten Pferdeantitoxins zu verursachen.

Ueber die Gründe, warum auch bei den bisher noch nicht mit Pferdeserum behandelten Schafen eingespritztes Antitoxin sich so verschieden verhält, indem es bei den einen rasch ausgeschieden wird (Schaf 58 dieser Arbeit, Schaf 51 der früheren Arbeit) und bei den anderen sich über Monate hält (Schafe 91 und 113 dieser Arbeit, Schafe 105, 104, 107, 96, 101, 103, 100 und 99 der früheren Arbeit), vermag ich nichts Bestimmtes auszusagen. Ich habe untersucht, ob sich präzipitierende Antikörper gegen Pferdeserumeiweiß im Blutserum der antitoxinbehandelten Schafe nachweisen lassen, und kann kurz dahin resumieren, daß ich im Blute aller der Schafe, bei denen sich das Antitoxin lange hielt, niemals Präzipitine gegen Pferdeeweiß nachweisen konnte. Mit dem Serum der Schafe 33 und 59 konnte dagegen in  $\frac{1}{10}$ -Verdünnung frisch gewonnenen Pferdeserums eine schwache Präzipitinreaktion erzielt werden. Die Schafe 51 und 58, bei denen ebenfalls Antitoxin rasch ausgeschieden wurde, ließen dagegen keinen nachweisbaren Präzipitingehalt ihres Blutserums erkennen. Es scheint mir nach diesem Befund nicht unmöglich, daß die rasche Ausscheidung des Antitoxins, wenn sie bei den Schafen eintritt, auf Präzipitinbildung zurückzuführen ist. Bei den Schafen 51 und 58 war sie vermutlich zu schwach, um mit den üblichen Methoden nachgewiesen werden zu können.

#### Zusammenfassung.

1) Der in einer früheren Arbeit gemeinsam mit Sames geführte Nachweis, daß sich Tetanusantitoxin, stammend vom Pferde, im Organismus junger Schafe sehr lange halten kann (bis zu 6 Monaten), wird in der vorliegenden Arbeit durch Untersuchungen an erwachsenen Schafen im gleichen Sinne ergänzt.

2) Diphtherieantitoxin, stammend vom Pferde, verhält sich hinsichtlich seiner Haltbarkeit im Schaforganismus im Prinzip ebenso wie Tetanusantitoxin.

3) Bei manchen Schafen findet eine rasche Ausscheidung sowohl des Diphtherietoxins wie des Tetanusantitoxins statt, ohne daß dafür besondere Gründe mit Sicherheit verantwortlich zu machen sind.

4) Eine frühere Behandlung mit Pferdeserum beschleunigt die Ausscheidung von Pferdeantitoxin aus dem Schaforganismus.

---

*Nachdruck verboten.*

[Aus dem Institut für Hygiene und experimentelle Therapie zu Marburg (Direktor: Wirkl. Geh.-Rat Prof. Dr. v. Behring).]

### **Antitoxin und Eiweiß.**

Von Prof. Dr. **Paul H. Römer.**

(Eingegangen bei der Redaktion am 16. Februar 1912.)

Im nachfolgenden soll eine größere Anzahl von Versuchsreihen, die die Beziehungen der antitoxischen Funktion zum Blutserumeiweiß behandeln, mitgeteilt werden. Es handelt sich um Versuche, die zum größten Teil bereits vor längerer Zeit abgeschlossen waren, ihre Publikation unterblieb aber, trotz eines in einer früheren Arbeit<sup>1)</sup> gegebenen entsprechenden Hinweises, da die Ergebnisse der Untersuchungen nicht klar deutbar waren. Obwohl auch jetzt nur auf hypothetischem Wege eine gewisse Erklärung der nachfolgenden eigenartigen Befunde gegeben werden kann, veranlassen mich zu dieser Mitteilung die Arbeiten Landsteiners und Praseks<sup>2)</sup>, sowie Doerrs und Picks<sup>3)</sup>, deren Untersuchungen sich in ähnlicher Richtung bewegen. Ich komme auf die genannten Arbeiten späterhin zurück, um erst auf meine eigenen, zum Teil in Gemeinschaft mit Dr. Sames ausgeführten Unter-

1) Diese Zeitschr., Bd. 3, Heft 1.

2) Diese Zeitschr., Bd. 10, Heft 1.2.

3) Centralbl. f. Bakt. etc., Orig., Bd. 62.

suchungen einzugehen und speziell zunächst auf die Gesichtspunkte, von denen sie ausgingen.

Durch eine Reihe von Autoren [Salge<sup>1)</sup>, Römer und Much<sup>2)</sup>, Much<sup>3)</sup>, Römer und Sames<sup>4)</sup>] ist nachgewiesen worden, daß bei verschiedenen Tierarten (Rind, Schaf), sowie auch beim Menschen durch die Säugung ziemlich beträchtliche Mengen von Antitoxin übertragen werden, wenn die säugende Mutter bzw. Amme subkutan mit antitoxinhaltigem Pferdeserum injiziert worden ist, während die Antitoxinresorption beim Neugeborenen ausbleibt bzw. viel geringer ausfällt, wenn das gleiche antitoxische Serum in entsprechenden und selbst noch größeren Mengen dem Säugling mit der Flasche verfüttert wird. Angesichts der Uebereinstimmung in dem Ergebnis der zitierten Untersuchungen muß diese Tatsache wohl als eine gesetzmäßige gelten. Ich selbst habe — bisher allerdings nur in einem Versuch — sogar zeigen können<sup>5)</sup>, daß diese Verhältnisse auch dann Geltung haben, wenn sie Pferde betreffen, also die gleiche Tierart, von der das antitoxische Serum stammt.

Unser kausales Bedürfnis sucht natürlich nach einem Verständnis dieser eigenartigen Tatsache. Römer und Much kamen in ihrer Arbeit zu der Schlußfolgerung, daß die Milchdrüse das injizierte Antitoxin so umformen müsse, daß es nunmehr leichter resorbierbar werde. Auf grob chemischem Wege war es unmöglich. Aufschlüsse über eine eventuelle „Umformung“ des Antitoxins bei seinem Uebergang aus dem Blut in die Milch festzustellen, wohl aber eröffneten biologische Eiweißreaktionen hier die Möglichkeit einer Analyse. Und so fanden Römer und Much in einem Fall folgende Erscheinung: Die Molke einer Kuhmilch, der außerhalb des Tierkörpers tetanusantitoxinhaltiges Pferdeserum zugesetzt war, gab mit einem präzipitierenden Pferdeantiserum typische Fällung, während sie ausblieb mit einer Molke, die dadurch tetanusantitoxinhaltig gemacht war, daß der be-

1) Jahrb. f. Kinderheilk., Bd. 61, Heft 3.

2) Jahrb. f. Kinderheilk., Bd. 63, Heft 6.

3) Münchener med. Wochenschr., 1907, No. 52.

4) Diese Zeitschr., Bd. 3, Heft 1.

5) Diese Zeitschr., Bd. 1, Heft 2.

treffenden Milchkuh tetanusantitoxinhaltiges Pferdeserum subkutan injiziert war. Dabei entsprach der Antitoxingehalt dieser letzten nicht reagierenden Molke, der doch nur von dem eingespritzten Pferdeserum herrühren konnte, genau dem jener ersten Molke. Damals war nur diese eine Untersuchung möglich und deshalb konnten Römer und Much nur vorläufige Schlußfolgerungen ziehen, die dann erst endgültige hätten werden dürfen, wenn weitere Beobachtungen dieses Phänomen als gesetzmäßig erkannt hätten. Hamburger<sup>1)</sup> hat nun diesen Versuch an Kaninchen und an einer Ziege nachgeprüft, ohne ihn bestätigen zu können. Er fand nach subkutaner Injektion von Tetanusserum bei milchliefernden Kaninchen und einer Ziege, daß die Milch dieser Tiere mit einem präzipitierenden Antipferdeserum prompt reagierte, also stets nachweisbares Pferdeeiweiß enthielt. Nun bestehen aber, ganz abgesehen davon, daß Hamburger andere Tierarten untersuchte, zwischen seiner Versuchsanordnung und der Römers und Muchs gewisse Differenzen.

Hamburger hat, wenigstens in seinen Kaninchenversuchen, ganz ungeheure Dosen Pferdeserum den milchliefernden Tieren eingespritzt, Dosen, wie sie „ungefähr der Injektion von mehreren Litern Serum bei Kühen entsprechen würden“. Es wäre wohl möglich, daß durch diese etwas gewaltsame Versuchsanordnung Läsionen, eine Art Durchbruchspforte in dem Gewebe der Milchdrüse geschaffen wären, durch die das eingespritzte Pferdeserum als solches rasch in die Milch hätte treten können. Für die Berechtigung der Annahme einer solchen Möglichkeit scheinen einige Beobachtungsergebnisse Hamburgers zu sprechen.

Aus seinen Angaben läßt sich nur schwer ein Verhältnis der in die Milch übergetretenen Antitoxinmenge im Vergleich zu der im Blute der milchliefernden Tiere vorhandenen quantitativ berechnen, zumal er die Antitoxinmenge im Blut des Muttertieres nicht bestimmt hat. Es scheint aber die Menge des in die Milch übergegangenen Antitoxins eine nicht geringe zu sein. Sagt doch Hamburger selbst: „Es fällt . . . die hohe Schutzkraft des Mageninhaltes auf“. (Ham-

1) Münchener med. Wochenschr., 1907, No. 6.

burger untersuchte statt der Milch direkt den Mageninhalt der mit ihr gefütterten Tiere.) Ferner ist sehr auffallend die enorme Differenz im Antitoxingehalt des Blutserums der mit der antitoxischen Milch gefütterten Jungen und der Milch selbst. Letzterer war etwa 400mal höher. In den Versuchen von Römer und Much betrug diese Differenz höchstens 2–3. Sollte nicht in der Tatsache, daß in Hamburgers Versuchen so außerordentlich wenig Antitoxin von den jungen Tieren resorbiert ist, ein direkter Hinweis liegen, daß seine Versuchsanordnung mit der Römers und Muchs, bei der mindestens  $\frac{1}{10}$  der gesamten verfütterten Antitoxinmenge im Blute der gefütterten Jungen wiedergefunden wurde, sich nicht ohne weiteres vergleichen läßt?

Inzwischen hat Much beim Menschen die mit Römer am Rinde ausgeführten Untersuchungen wiederholt mit dem gleichen Ergebnis. Es ging bedeutend mehr Antitoxin auf den Säugling über, wenn er der stillenden Mutter das antitoxinhaltige Pferdeserum subkutan injizierte, als wenn er es den Säuglingen direkt mit der Flasche reichte. In der Milch solcher mit antitoxischem Pferdeserum subkutan behandelter Mütter konnte er — wiederum genau entsprechend unserer früheren Beobachtung — weder mit der Präzipitationsmethode noch mit der Komplementablenkungsmethode Pferdeserumeiweiß nachweisen.

**I. Antitoxingehalt und Gehalt an präzipitabilem bzw. komplementbindendem Pferdeeiweiß in der Milch subkutan mit tetanusantitoxinhaltigem Pferdeserum behandelter Schafe.**

In Gemeinschaft mit Sames habe ich vor einiger Zeit in dieser Zeitschrift eine Arbeit veröffentlicht<sup>1)</sup>, die wiederum eindeutige Beweise für die Tatsache liefert, daß indirekt (d. h. durch Umweg über das Muttertier) verfüttertes Pferdeantitoxin bei jungen Schafen in viel beträchtlicheren Mengen übergeht, als unter den gleichen Bedingungen direkt verfüttertes. Wir haben diese Gelegenheit nicht vorübergehen lassen, ohne von neuem Versuche darüber anzustellen, welches der Grund in der Differenz der quantitativen Resorption des Antitoxins

1) a. a. O.

unter den genannten Versuchsbedingungen sei. Wir legten uns die Frage vor: Läßt sich mit Hilfe biologischer Reaktionen (Präzipitationsreaktion, Komplementbindungsreaktion) irgendeine Differenz nachweisen zwischen einer Milch, der man künstlich außerhalb des Tierkörpers tetanusantitoxinhaltiges Pferdeserum zugesetzt hat, und solcher Milch, die den Antitoxingehalt einer subkutanen Injektion des Muttertieres mit dem gleichen Serum verdankt?

### Versuchsreihe 1.

Für den ersten derartigen Versuch standen uns 6 verschiedene Schafmilchen bzw. daraus gewonnene Molken zur Verfügung.

Die Molke wurde in der Weise gewonnen, daß zu 5 ccm Milch tropfenweise 30-proz. Essigsäure bis zur Ausfällung des Kaseins (in der Regel 5–8 Tropfen) zugesetzt werden und dann auf 10 ccm Flüssigkeit mit physiologischer Kochsalzlösung aufgefüllt wird. Außerdem wird jede Molke mit Normalnatronlauge genau neutralisiert. Zur Verfügung standen:

a) Normalmolken der Schafe 60 und 47 (normale Schafe, noch nie mit Tetanusantitoxin behandelt, Milch frei von Tetanusantitoxin);

b) Molken der Schafe 60 und 47 mit künstlichem Zusatz von  $\frac{1}{1500}$ ,  $\frac{1}{2000}$ ,  $\frac{1}{3000}$ ,  $\frac{1}{7500}$ ,  $\frac{1}{15000}$  und  $\frac{1}{20000}$  des 5,5-fachen Tetanus-Heilserums (Tet.H.S.) No. 3 pro ccm Molke;

c) Molke des Schafes 51 vom 9. III. 1909 (Schaf 51 hatte am 3. III. 1909 subkutan 286 Tetanus-Antitoxin-Einheiten [Tet.A.E.] des Tet.H.S. No. 3 erhalten. Die Milch enthielt  $\frac{1}{160}$  A.E. pro ccm);

d) Molke von Schaf 70 vom 28. II. 1909 (Schaf 70 hatte am 26. II. 1909 subkutan 275 Tet.A.E. des Tet.H.S. No. 3 erhalten. Die Milch enthielt  $\frac{1}{500}$  A.E. pro ccm);

e) die Molke des Schafes 34 vom 21. II. 1909 (Schaf 34 hatte am 19. II. 1909 subkutan 286 Tet.A.E. des Tet.H.S. No. 3 erhalten. Die Milch enthielt  $\frac{1}{450}$  A.E. pro ccm);

f) die Molke von Schaf 41 vom 5. III. 1909 (Schaf 41 hatte am 3. III. 1909 subkutan 286 Tet.A.E. des Tet.H.S. No. 3 erhalten. Die Milch enthielt  $\frac{1}{80}$  A.E. pro ccm).

Die eben aufgeführten Molkenproben wurden mit präzipitierendem Pferdeantiserum (gewonnen vom Kaninchen 871 durch intraperitoneale Vorbehandlung mit Pferdeserum) versetzt, und zwar jedesmal 1 ccm Molke mit 0,1 ccm Pferdeantiserum. Das Serum eines normalen Kaninchens rief in keiner der genannten Molken eine Trübung hervor. Das Ergebnis des Versuches enthält die Tabelle I.

Tabelle I.

1 ccm der Molke	+ 0,1 ccm Antiserum	
	nach 1 Stunde	nach 24 Stunden
Schaf 60	0	0
" 60 + $\frac{1}{1500}$ Tet.H.S. No. 3	Fällung	Niederschlag
" 60 + $\frac{1}{3000}$ " " "	3 Starke Trübung	"
" 60 + $\frac{1}{7500}$ " " "	3 Geringe Trübung	"
" 60 + $\frac{1}{15000}$ " " "	3 Trübung	"
" 60 + $\frac{1}{30000}$ " " "	3 Opaleszenz	Spur Niederschlag
Schaf 47	0	0
" 47 + $\frac{1}{1500}$ Tet.H.S. No. 3	Sehr starke Trübung	Niederschlag
" 47 + $\frac{1}{3000}$ " " "	3 dgl.	"
" 47 + $\frac{1}{7500}$ " " "	3 Mäßige Trübung	"
" 47 + $\frac{1}{15000}$ " " "	3 Spur Trübung	"
" 47 + $\frac{1}{30000}$ " " "	3 Opaleszenz	Spur Niederschlag
Schaf 51	0	Trübung
" 70	0	0
" 34	0	0
" 41	0	0
$\frac{1}{2}$ Molke Schaf 41	0	0
$\frac{1}{6}$ " " 41	0	0
$\frac{1}{6}$ " " 41	0	0
Physiologische Kochsalzlösung	0	0

Ergebnis: Das Antipferdeserum Kaninchen 871 ruft in der Normalmolke der Schafe 60 und 47 keine Spur Trübung hervor, wohl aber prompt nach Zusatz von Pferdeserum bis zu  $\frac{1}{20000}$  pro ccm. Die Molken der subkutan mit dem gleichen Tet.H.S. behandelten Schafe No. 70, 34 und 41 zeigen keine Spur einer Reaktion, trotz des nur auf die Tet.H.S.-Injektion zu beziehenden Antitoxingehalts der Milch. Die Molke von Schaf 51 zeigt eine ganz schwache, verzögerte Präzipitinreaktion.

Der Antitoxingehalt der Molken von Schaf 51, 70, 34 und 41 betrug auf Grund obiger Berechnung  $\frac{1}{300}$  bzw.  $\frac{1}{1000}$  bzw.  $\frac{1}{900}$  bzw.  $\frac{1}{160}$  A.E. Es würde das, da das Antitoxin einem 5,5-fachen Tetanusserum entstammt, entsprechen  $\frac{1}{1650}$  ccm bzw.  $\frac{1}{5500}$  ccm bzw.  $\frac{1}{4950}$  ccm bzw.  $\frac{1}{880}$  ccm Pferdeserum, falls dem in der Molke nachgewiesenen Antitoxingehalt die Menge des biologisch nachweisbaren Pferdeserumeiweißes in der Molke entsprechen würde. Trotzdem reagierten die Molken 34, 70 und 41 nicht mit dem Präzipitinserum, das, wie die Kontrollen zeigen, an sich mit erheblich größerer Verdünnung des Pferdeserums noch reagiert (bis  $\frac{1}{20000}$  ccm Pferdeserum).

Die Molke Schaf 51 enthielt dagegen nachweisbare Pferde-eiweißmengen, wenn auch, soweit man urteilen kann, geringere, als man nach dem Antitoxingehalt erwarten durfte. Ich verweise hier auf die frühere Arbeit mit Sames in dieser Zeitschrift (Bd. 3, Heft 1) und speziell den dort auf p. 57 näher beschriebenen Versuch an Schaf 51. Schaf 51 ist das einzige der untersuchten Tiere, bei dem nach subkutaner Injektion des Tetanusserums ein intrauteriner Uebergang von Antitoxin auf das Neugeborene stattfand. Es ist denkbar, daß Schaf 51 gegen Pferdeserum besonders empfindlich ist und so irgendeine pathologische Durchlässigkeit der Milchdrüse für das im Blut kreisende Pferdeserum geschaffen wurde, die den direkten Durchtritt des Pferdeserumeiweißes erlaubte. Das Schaf 51 nimmt auch insofern eine Ausnahmestellung ein, als, wie wir in einer weiteren Arbeit über die Haltbarkeit des heterologen Antitoxins im Organismus<sup>1)</sup> gezeigt haben, dieses das einzige war, bei dem wir eine ungewöhnlich rasche Ausscheidung des Antitoxins fanden.

Wir kommen somit bei der Untersuchung von 4 Molken, gewonnen von Schafen, denen subkutan tetanusantitoxinhaltiges Pferdeserum injiziert worden war, zu dem Ergebnis, daß in dreien derselben sich mit Hilfe der Präzipitinreaktion kein Pferdeserumeiweiß nachweisen ließ, trotz eines nur auf jene Seruminjektion zu beziehenden Antitoxingehaltes [normale Schafe besitzen kein Antitoxin im Blut, vgl. unsere frühere Arbeit<sup>1)</sup>]. Denn der in der Milch der erwähnten Schafe nachgewiesene Antitoxingehalt mußte Pferdeserummengen entsprechen, die prompt mit dem Antiserum reagieren mußten, falls das in die Milch übergegangene Antitoxin noch als biologisch nachweisbares Pferdeserumeiweiß in der Milch erschiene. In der Milch von Schaf 51 konnten wir eine gewisse, allerdings verglichen mit dem Antitoxingehalt, relativ geringe Menge von Pferdeserumeiweiß nachweisen. Es lagen in diesem Falle aber die besonderen oben geschilderten Verhältnisse vor. Wir finden also in unseren

1) Diese Zeitschrift, Bd. 4, H. 3.



Versuchen im wesentlichen eine Wiederholung des von Römer und Much früher beim Rinde und dann von Much beim Menschen beschriebenen Phänomens, daß nach Injektion eines milchliefenden Individuums mit tetanusantitoxinhaltigem Pferdeserum, Antitoxine in recht beträchtlichen Mengen in die Milch übergehen, ohne dort durch die Präzipitinreaktion als Pferdeserumeiweiß nachgewiesen werden zu können.

### Versuchsreihe 2.

Zur Ergänzung der Präzipitinversuche habe ich noch die Komplementbindungsmethode herangezogen, indem ich die gleichen normalen Molken und antitoxischen Molken nach der Komplementbindungsmethode prüfte. Ich ging dabei genau nach den Vorschriften vor, welche Sachs und Rickmann für die praktische Ausführung der Komplementbindungsversuche zum biologischen Eiweißnachweis empfohlen haben.

Es stand für diese Komplementbindungsversuche folgendes Material zur Verfügung:

a) Das hämolytische System, d. h. stets frisch gewonnene, durch mehrmaliges Waschen und Zentrifugieren des defibrinierten Blutes gewonnene Aufschwemmung (5 Proz.) von Schafblutkörperchen in 0,85-proz. Kochsalzlösung (verwandte Menge 0,5 ccm); das Serum frisch getöteter normaler Meerschweinchen (Komplement,  $1\frac{1}{2}$ -fach lösende Dosis = 0,05 ccm) sowie das inaktivierte Serum eines mit Schafblutkörperchen vorbehandelten Kaninchens ( $1\frac{1}{2}$ -fach lösende Dosis = 0,5 ccm  $\frac{1}{1500}$  Serum);

b) Pferdeantiserum, d. h. das Serum eines mit Pferdeserum intraperitoneal behandelten Kaninchens. Dasselbe wurde inaktiviert verwandt. Nicht inaktiviert hatte es den Präzipitintiter 1 : 25 000. Dosen von 0,2 bis 0,02 des inaktivierten Antiserums gaben mit  $\frac{1}{10000}$  ccm des Tetanusserums No. 3 prompt Komplementbindung. Als Testdosis wurden 0,025 ccm des Antiserums gewählt; sie gaben bis zu  $\frac{1}{40000}$  des Tet.H.S. No. 3 Komplementbindung;

c) Tetanusserum No. 3 vom Pferde stammend, pro ccm enthaltend 5,5 Tet.-A.E., inaktiviert;

d) inaktiviertes normales Kaninchenserum;

e) normale Molke Schaf 47 und Schaf 60, gewonnen nach der auf p. 264 beschriebenen Weise, inaktiviert und isotonisch gemacht;

f) die antitoxischen Molken von Schaf 51 vom 9. III. 09, Schaf 70 vom 1. III. 09, Schaf 34 vom 21. II. 09 und Schaf 41 vom 5. III. 09 mit einem Antitoxingehalt von  $\frac{1}{300}$  A.E. pro ccm bzw.  $\frac{1}{100}$  bzw.  $\frac{1}{900}$  bzw.  $\frac{1}{150}$  A.E. Falls diesem Antitoxingehalt der Pferdeserumeiweißgehalt parallel ging, würden die genannten Molken entsprechen etwa einer Pferdeserum-

Verdünnung 1:1650, bzw. 1:5500, bzw. 1:4950, bzw. 1:880. Die Molken waren sämtlich inaktiviert und durch Kochsalzzusatz isotonisch gemacht.

Die sämtlichen nachfolgenden Versuche wurden, um eine Veränderung der Reagentien zu vermeiden, in 2 Tagen ausgeführt. Die Flüssigkeitsmenge wurde in jedem Röhrchen mit isotonischer Kochsalzlösung auf 2,5 ccm ergänzt. Kontrollversuche ergaben, daß die benutzten Molken an sich weder hämolytisch wirkten, noch für sich allein oder zusammen mit einem normalen Kaninchenserum die Hämolyse hemmten. Ich verzichte auf die Einzelmitteilung dieser durchaus eindeutig ausgefallenen Kontrollversuche und teile in Tabelle II nur den endgültigen Komplementbindungsversuch mit. Zur Erläuterung sei noch hinzugefügt, daß wir unter Antitoxinmolke I, Antitoxinmolke II und Antitoxinmolke III Molken des normalen Schafes 47 verstehen, denen künstlich (in vitro) von dem benutzten Tetanusserum soviel zugesetzt war, daß 1 ccm enthielt: in Antitoxinmolke I =  $\frac{1}{7500}$  ccm Pferdeserum, in Antitoxinmolke II =  $\frac{1}{15000}$  ccm Pferdeserum und in Antitoxinmolke III =  $\frac{1}{30000}$  ccm Pferdeserum.

Tabelle II.

0,5 ccm	Pferde- antiser. 791 ccm	Meer- schw.- Serum ccm	Hämolyt. Immun- serum ccm	Schaf- blutkörperchen ccm	Ergebnis
Molke Schaf 60	0,025	0,5 10 %	0,5 $\frac{1}{1500}$	0,5 5 %	komplett
„ „ 47	„	dgl.	dgl.	dgl.	„
Antitoxinmolke I	„	„	„	„	0
„ II	„	„	„	„	0
„ III	„	„	„	„	0
Molke Schaf 51	„	„	„	„	0
„ „ „ $\frac{1}{2}$	„	„	„	„	wenig Hämol.
„ „ „ $\frac{1}{4}$	„	„	„	„	fast komplett
„ „ „ $\frac{1}{8}$	„	„	„	„	„ „
Molke Schaf 70	„	„	„	„	komplett
„ „ „ $\frac{1}{2}$	„	„	„	„	„
„ „ „ $\frac{1}{4}$	„	„	„	„	„
Molke Schaf 34	„	„	„	„	„
„ „ „ $\frac{1}{2}$	„	„	„	„	„
„ „ „ $\frac{1}{4}$	„	„	„	„	„
Molke Schaf 41	„	„	„	„	„
„ „ „ $\frac{1}{5}$	„	„	„	„	„
„ „ „ $\frac{1}{10}$	„	„	„	„	„
„ „ „ $\frac{1}{20}$	„	„	„	„	„

Die normalen Molken Schaf 47 und Schaf 60, die sich bei der tierexperimentellen Prüfung auch frei von Tetanusantitoxin erwiesen, enthielten dementsprechend auch kein mit der Komplementbindungsmethode nachweisbares Pferdeserumeiweiß; wohl aber gab die Molke Schaf 47, der künstlich

Pferdeserum zugesetzt war (Antitoxinmolke), in eindeutiger Weise die Komplementbindungsreaktion auch noch mit der Pferdeserumverdünnung 1:30 000, entsprechend dem vorher ermittelten Werte des Antiserums. Die Molken von Schaf 70, Schaf 34 und Schaf 41 gaben selbst konzentriert keine Spur einer Komplementbindungsreaktion, trotz ihres zum Teil recht beträchtlichen Antitoxingehaltes, der, wie oben berechnet, bei Schaf 70  $\frac{1}{5500}$  ccm, bei Schaf 34  $\frac{1}{4950}$  ccm und bei Schaf 41 sogar  $\frac{1}{880}$  ccm Pferdeserum entsprechen würde, wenn das in den Molken nachgewiesene Antitoxin noch an biologisch nachweisbarem Pferdeserumeiweiß haften würde. Es entspricht somit der negative Ausfall des Komplementbindungsversuches mit den Molken Schaf 70, Schaf 34 und Schaf 41 genau dem Ausfall der auf p. 265 mitgeteilten Präzipitinversuche. Ebenso entspricht dem Ergebnis des auf p. 265 mitgeteilten Präzipitinversuches der Komplementbindungsversuch mit der Molke von Schaf 51. In dieser wurde mit der Komplementbindungsmethode Pferdeeisweiß nachgewiesen; denn sie gab mit der Testdosis des Pferdeantiserums vollständige Komplementbindung, in der Dosis von 0,5 ccm eine nahezu vollständige; in der Dosis von 0,25 ccm und auch bei 0,125 ccm machen sich noch Andeutungen von Hämolysehemmung bemerkbar. Immerhin ist auch mittels der Komplementbindungsmethode in der Molke Schaf 51 eine geringere Menge Pferdeserumeiweiß nachweisbar, als man nach dem Ergebnis der Antitoxinprüfung hätte erwarten sollen. 1 ccm Molke enthielt  $\frac{1}{300}$  A.E., was  $\frac{1}{1650}$  ccm Pferdeserum entsprechen würde. Wir hätten also mit  $\frac{1}{8}$  Molke Schaf 51 ( $= \frac{1}{13200}$  ccm Pferdeserum) noch vollständige Hämolysehemmung bekommen müssen, wenn alles Antitoxin noch an biologisch nachweisbarem Pferdeserumeiweiß haftete.

Insgesamt also finden wir eine völlige Uebereinstimmung dieser Komplementbindungsversuche mit den Präzipitinversuchen und somit eine völlige Bestätigung der in der früheren Arbeit von Römer und Much bzw. in der späteren Arbeit Muchs mitgeteilten Tatsache, daß bei

Individuen, die subkutan vom Pferde stammendes Serum erhalten haben, Antitoxin in beträchtlichen Mengen in die Milch übergehen kann, ohne mit Hilfe unserer feinsten biologischen Methoden als pferdeserumeiweißhaltig erkannt werden zu können. Die negativen Ergebnisse Hamburgers vermögen wir uns vorläufig nur in dem Sinne zu erklären, wie wir es oben auf p. 262 versucht haben.

**II. Antitoxingehalt und Gehalt an präzipitabilem Pferdeeweiß im Serum von Schafen, die mit tetanusantitoxinhaltigem Pferdeserum subkutan eingespritzt bzw. direkt oder indirekt gefüttert sind.**

Die frühere Annahme Römers und Muchs, daß das Antitoxin bei seiner Passage durch die Brustdrüse durch diese eine Modifikation erfährt, in dem Sinne, daß es nun nicht mehr mit einem spezifischen Pferdeantiserum zu reagieren vermag, bedarf nach meinen weiteren Untersuchungen einer gewissen Korrektur. Römer und Much waren in ihrer früheren Arbeit von der stillschweigenden Voraussetzung ausgegangen, daß erst durch die Brustdrüse das Antitoxin seine Reaktionsfähigkeit mit einem spezifischen Pferdeantiserum verloren hätte, und sie machten demgemäß eine eigenartige, noch unerklärbare Funktion der Milchdrüse für die vermutete Modifikation verantwortlich. Die Schlußfolgerung bedeutet aber einen logischen Sprung, weil noch nicht die Frage beantwortet war, ob denn im Blutserum des mit antitoxischem Pferdeserum subkutan injizierten Muttertieres das Antitoxin noch nachweisbar geknüpft an biologisch nachweisbares Pferdeserumeiweiß kreise.

Aufklärung über diesen Punkt verschafften Versuche, die zunächst im Sinne der Römer-Muchschen Hypothese angestellt wurden, daß die Passage durch die Milchdrüse die nachgewiesene eigenartige Modifikation des antitoxischen Eiweißes bewirkt. Ich sagte mir, daß, wenn in der Tat die Passage durch die Milchdrüse das antitoxische Pferdeserumeiweiß so verändert, daß es nachher in der Milch bzw. Molke nicht mehr durch die bekannten biologischen Methoden als Pferdeeweiß erkennbar ist, so muß dementsprechend auch

das Blutserum der jungen Schafe, die mit solcher antitoxin-haltiger, aber anscheinend pferdeserumeiweißfreier Molke gefüttert waren, trotz seines Antitoxingehaltes frei von biologisch nachweisbarem Pferdeserum sein. Andererseits mußte, wenn diese Hypothese richtig war, im Blutserum derjenigen jungen Schafe, welche direkt mit antitoxischem Pferdeserum gefüttert waren, oder direkt antitoxisches Pferdeserum subkutan erhalten hatten, nicht nur Antitoxin sondern auch Pferdeserumeiweiß nachweisbar sein. Wir untersuchten dementsprechend das Blutserum aller derjenigen Schafe, welche subkutan antitoxisches Tetanusserum erhalten hatten, und derer, welche direkt und indirekt mit Antitoxin gefüttert waren. Es wurden die Blutsera verschiedener Einzel-Blutabnahmen geprüft. Die Untersuchung erstreckte sich auf die Ermittlung des Antitoxingehaltes und die Prüfung des klar abgeschiedenen Serums mit einem ebenfalls absolut klaren hochwertigen Pferdeantiserum, gewonnen vom Kaninchen 781.

Die Prüfungen auf Präzipitinreaktion fanden sämtlich an zwei aufeinanderfolgenden Tagen statt. Wir stellen zunächst in Tabelle III die Kontrollversuche voran, die gleichzeitig mit der Untersuchung der nachfolgenden Schafsera angestellt wurden. Als Kontrollserum diente uns das Serum eines unbehandelten Schafes No. 58, dem wir auf 1 ccm  $\frac{1}{1000}$  ccm bzw.  $\frac{1}{10000}$  ccm bzw.  $\frac{1}{20000}$  ccm Tetanusserum in vitro zugemischt hatten. Das präzipitierende Pferdeantiserum war in allen Versuchen dasselbe (Antipferdeserum 781).

Tabelle III.

	0,1 Antipferdeserum 781		
	nach $\frac{1}{2}$ Std.	nach 1 Std.	nach 24 Stdn.
1 ccm $\frac{1}{1000}$ Tet.-Serum (verdünnt in Kochsalzlösung)	Starke Trübung	Starke Trübung	Niederschlag
1 ccm $\frac{1}{10000}$ Tet.-Serum	Trübung	Trübung	"
1 " $\frac{1}{20000}$ " "	Opaleszenz	" 0	0
1 " Serum Schaf 58	0	0	0
1 " Serum Schaf 58 + $\frac{1}{1000}$ ccm Tet.-Ser.	Trübung	Trübung	Niederschlag
1 ccm Serum Schaf 58 + $\frac{1}{10000}$ ccm Tet.-Serum	Opaleszenz	Niederschlag	"
1 ccm Serum Schaf 58 + $\frac{1}{20000}$ ccm Tet.-Serum	0	"	Trübung

Die Kontrollversuche ergeben also, daß das Antipferdeserum in einer Verdünnung des Tetanusserums unter Be-

nutzung von physiologischer Kochsalzlösung als Verdünnungsflüssigkeit ganz prompt noch bis zur Verdünnung 1:20000 die spezifische Reaktion gibt. Gegenüber der im Schafserum verdünnten Pferdeserumlösung wirkt das Antipferdeserum ebenfalls in ähnlicher Stärke, allerdings war der zeitliche Eintritt der Reaktion etwas verzögert. Das normale Serum Schaf 58 ohne Zusatz des Pferdeserums reagierte nicht mit dem Antipferdeserum. Auch noch mehrere andere Sera normaler Schafe reagierten nicht mit dem Antipferdeserum, wohl aber prompt, sobald künstlich das Tetanusserum in Verdünnungen von 1:1000 bis 1:20000 zugesetzt wurde.

Das Ergebnis der Prüfungen der antitoxischen Schafsera auf Gehalt an Pferdeserumeiweiß enthalten die nachfolgenden Tabellen. Das Resultat der Antitoxinprüfungen findet sich in den Tabellen summarisch verzeichnet. (Als Belege für die Berechnung des Antitoxingehaltes verweise ich auf frühere in dieser Zeitschrift [Bd. III und IV] veröffentlichte Arbeiten, in denen sich die entsprechenden Antitoxinbestimmungen unter Beifügung der einzelnen Protokolle des Genaueren finden.)

#### A. Prüfung des Serums von Schafen, denen subkutan Tetanusserum injiziert worden war.

(Die Versuche wurden in der Weise angestellt, daß in Spitzgläschen zu je 1 ccm klaren Schafserums 0,1 ccm des hochwertigen Pferdeantiserums 781 ohne zu schütteln zugesetzt, dann nach 30 Minuten, 60 Minuten und 24 Stunden das Ergebnis registriert wurde. In den nachfolgenden Tabellen ist nur das nach 24 Stunden registrierte Ergebnis verzeichnet.)

(Siehe Tabelle IV auf p. 273.)

Die „berechnete Pferdeserummenge“ in der 6. Rubrik der Tabelle IV ist unter Zugrundelegung des Antitoxingehalts des Ausgangsserums (1 ccm = 5,5 A.E.) festgestellt worden. Wenn also beispielsweise 1 ccm des Serums Schaf 70 vom 1. III. 09  $\frac{1}{70}$  A.E. enthielt, so mußte, da 5,5 A.E. 1 ccm Pferdeserum entsprechen, 1 ccm des Schafserums enthalten  $\frac{1}{5,5} \times 70 = \frac{1}{385}$  ccm Pferdeserum. In der gleichen Weise sind die übrigen Berechnungen vorgenommen worden.

Tabelle IV.

Schaf No.	Datum der Antitoxin-injektion	Menge des injizierten Antitoxins	Ergebnis der Antitoxinprüfung		Berechnete Pferdeserummengen ccm	Verhalten gegen Pferdeantiserum
			Datum	Menge der nachgewiesenen Tet.A.E. pro ccm		
70	26. II. 09	275 A.E.	1. III. 09	$\frac{1}{70}$ A.E.	$\frac{1}{895}$	starker Niederschlag
51	3. III. 09	286 „	9. III. 09	$\frac{1}{100}$ „	$\frac{1}{650}$	dgl.
			1. V. 09	0 „	0	0
99	23. II. 09	145 „	26. IV. 09	$\frac{1}{90}$ „	$\frac{1}{495}$	0
			28. V. 09	$\frac{1}{250}$ „	$\frac{1}{875}$	0
			24. VI. 09	$\frac{1}{600}$ „	$\frac{1}{3300}$	0
			24. VII. 09	$\frac{1}{1300}$ „	$\frac{1}{7150}$	0
			24. VIII. 09	$\frac{1}{1500}$ „	$\frac{1}{2250}$	0
100	1. III. 09	4,5 „	29. IV. 09	$\frac{1}{1000}$ „	$\frac{1}{5500}$	0
			28. V. 09	$\frac{1}{1500}$ „	$\frac{1}{2250}$	0
			27. VI. 09	$\frac{1}{1500}$ „	$\frac{1}{2250}$	0
41	3. III. 09	286 „	20. IV. 09	$\frac{1}{600}$ „	$\frac{1}{3300}$	0
			1. V. 09	$\frac{1}{750}$ „	$\frac{1}{4125}$	0
34	19. II. 09	286 „	20. IV. 09	$\frac{1}{4000}$ „	$\frac{1}{22000}$	0

Nur in dem Serum von Schaf 70 und 51 ließ sich also Pferdeserumeiweiß durch die Präzipitinreaktion nachweisen. In beiden Fällen handelt es sich um Sera, abgenommen 3 Tage bzw. 6 Tage nach der Seruminjektion. Bei allen übrigen Schafseris fiel die Präzipitinreaktion negativ aus, trotzdem zum Teil noch recht beträchtliche Mengen Antitoxins (vgl. Schaf 99 vom 26. IV.) in den Seris vorhanden waren. Die mit dem Pferdeantiserum nicht reagierenden Schafsera waren frühestens 7 Wochen (Schaf 41 vom 20. IV.) nach der Seruminjektion entnommen.

Ich fand also zu meiner größten Ueberraschung bei den subkutan mit tetanusantitoxinhaltigem Pferdeserum injizierten Schafen zwar lange Zeit nach der Seruminjektion noch nachweisbare und zum Teil recht beträchtliche Antitoxinmengen, konnte aber Pferdeeiweiß in den Seris derselben Schafe mit der Präzipitinreaktion schon nicht mehr nachweisen, wenn 7 Wochen nach der Seruminjektion vergangen waren.

Man könnte daran denken, daß vielleicht das Schafserum die Präzipitinreaktion hemmte. Dem sind wir aber durch die oben (Tabelle III) verzeichneten Kontrollversuche begegnet. Denn, wenn wir dasselbe Tetanusserum in vitro dem Serum normaler Schafe zusetzten (in Verdünnungen von  $\frac{1}{1000}$  ccm Pferdeserum bis zu  $\frac{1}{20000}$  ccm Pferdeserum pro 1 ccm Schafserum), so trat die Präzipitinreaktion ein, wenn diese künstlich mit Tetanusserum versetzten normalen Schafsera mit dem Antipferdeserum 781 versetzt wurden.

Noch eines ist bei vorstehendem Präzipitinversuch auffallend, nämlich, daß die konzentrierten Schafsera überhaupt nicht mit dem Antipferdeserum reagieren; denn wir wissen, daß hochwertige Antipferdesera vom Kaninchen auch in heterologen konzentrierten Blutlösungen eine gewisse Präzipitation erzeugen, zumal wenn erst 24 Stunden nach Anstellung des Versuches das Ergebnis registriert wird. Wir konnten aber feststellen, daß zwar frisch gewonnene Schafsera mit dem Antipferdeserum gelegentlich reagieren, daß sich dagegen diese nicht spezifische Präzipitinreaktion verliert, wenn die Schafsera einige Zeit unter Zusatz von 0,4 Proz. Karbol konserviert waren. Die obigen Sera wurden aber sämtlich erst August 1909 untersucht, also ca. 5 Monate nach der Gewinnung. Es wäre übrigens aus der Tatsache der so späten Untersuchung der Sera ein Einwand gegen die Bedeutung der negativen Ergebnisse der obigen Präzipitierungsversuche möglich. Man könnte daran denken, daß infolge der langen Konservierung das Pferdeserumeiweiß in den Schafseris seine Reaktionsfähigkeit gegenüber einem spezifischen Präzipitin verloren hat. Hiergegen spricht aber einmal die Erfahrungstatsache, daß sich diese Reaktionsfähigkeit durch Jahrzehnte lang in konserviertem Blut erhält. Konnte doch Uhlenhuth selbst in gefaultem Blut noch nach 2 Jahren mit Hilfe der Präzipitinreaktion den spezifischen Eiweißnachweis führen. Endlich spricht gegen diesen Einwand die Tatsache, daß die bald nach der Antitoxininjektion abgenommenen Sera der Schafe 70 und 51 prompt die spezifische Präzipitinreaktion gaben, obwohl sie ebenso lange konserviert waren, wie die übrigen Sera dieser Tabelle.



Das Verschwinden der präzipitablen Substanz aus dem Blutserum subkutan mit Tetanusserum behandelter Schafe mit nachweisbarem Antitoxingehalt tritt übrigens nicht in jedem Falle ein, wenigstens konnten wir in einem Falle eine Ausnahme finden: Schaf 91 (35 kg schwer) erhielt am 16. VIII. 09 26,5 ccm eines 5-fachen Tetanusserums subkutan. Eine vor der Seruminjektion abgenommene Blutprobe erwies sich frei von Tetanusantitoxin und reagierte nicht mit einem wirksamen präzipitierenden Antipferdeserum. Dem Schaf 91 wurden sodann Blutproben abgenommen, und zwar 2, 10, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180 und 210 Tage nach der Injektion und gleichzeitig auf Antitoxingehalt<sup>1)</sup> und Gehalt an präzipitabilem Pferdeeiweiß geprüft. Das Ergebnis enthält, summarisch zusammengefaßt, die nachfolgende Tabelle. (Das präzipitierende Antiserum hat einen Wert von ungefähr 1:25 000.)

Tabelle V.

Tage nach der Injektion	A.E. pro ccm	Berechnete Pferdeserummenge pro ccm	Präzipitinreaktion
2	1/17	1/85	positiv
10	1/33	1/165	"
15	1/50	1/250	"
30	1/300	1/1500	"
60	1/600	1/3300	spurweise positiv
90	1/1000	1/5000	0
120	1/3000	1/15000	0
150	Spuren	?	0
180	0	0	0
210	0	0	0

Im Serum des Schafes 91 konnte also bis zu 2 Monaten nach der Seruminjektion noch Pferdeserumeiweiß nachgewiesen werden; allerdings auch hier nicht in so beträchtlichen Mengen, als man nach dem berechneten Pferdeserumgehalt hätte erwarten müssen. Immerhin lehrt der Versuch, daß durchaus nicht in jedem Fall 4—5 Wochen nach einer Pferdeseruminjektion beim Schaf das biologisch nachweisbare Pferdeserumeiweiß aus dem Blutserum verschwunden sein muß.

1) Hinsichtlich der Antitoxinprüfungen verweise ich auf die in diesem Hefte publizierte Arbeit, in der sich die Einzelprotokolle aller Antitoxinprüfungen finden.

### B. Prüfung des Serums von Schafen, denen direkt Antitoxin verfüttert war.

(Die Prüfung fand in der gleichen Weise statt, wie unter A. Das Nähere bezüglich des Versuches an den beiden aufgeführten Schafen 101 und 103 ist enthalten in der früheren Arbeit [Bd. 3 dieser Zeitschr., p. 62 und 63].)

Tabelle VI.

Schaf No.	Datum der Antitoxin-injektion	Menge des verfütterten Antitoxins	Ergebnis der Serumprüfung		Berechnete Pferdeserummenge	Verhalten gegen Pferdeserumantiserum
			Datum	Menge der nachgewiesenen Tet.A.E. pro ccm		
101	23. II. bis 1. III. 09	288,75 A.E.	28. III. 09	$\frac{1}{950}$ A.E.	$\frac{1}{4950}$ ccm	Spur Opaleszenz
			24. IV. 09	$\frac{1}{1500}$ "	$\frac{1}{8250}$ "	0
103	2. III. bis 9. III. 09	288,75 "	1. V. 09	$\frac{1}{1800}$ "	$\frac{1}{8400}$ "	0
			30. V. 09	$\frac{1}{2400}$ "	$\frac{1}{12200}$ "	0

Im Serum Schaf 101 konnten 4 Wochen nach der Serumverfütterung noch höchstens Spuren von Pferdeeiweiß mittels der Präzipitinreaktion nachgewiesen werden, obwohl nach dem Ausfall der Kontrollversuche die Reaktion stark hätte ausfallen müssen, wenn die biologisch nachweisbare Eiweißmenge der Antitoxinmenge entsprochen hätte.

8 Wochen nach der Serumverfütterung war das Serum frei von nachweisbarem Pferdeserumeiweiß, ebenso das Serum 103.

### C. Prüfung des Serums von Schafen, denen indirekt Antitoxin verfüttert war.

(Die Schafe waren mit der Milch ihrer Mütter ernährt worden, denen subkutan Tetanusserum injiziert worden war. Das Nähere bezüglich der an Schaf 107, 104 und 105 angestellten Versuche enthält wieder die frühere Arbeit [Bd. 3 dieser Zeitschr., p. 53—59]. Die Prüfung des Serums mit Hilfe der Präzipitinreaktion fand in der gleichen Weise wie unter A statt.)

Tabelle VII.

Schaf No.	Datum der Antitoxinfütterung	Menge des verfütterten Antitoxins	Ergebnis der Serumprüfung		Berechnete Pferdeserummenge	Verhalten gegen Pferdeserumantiserum
			Datum	Menge der nachgewiesenen Tet.A.E. pro ccm		
107	9. III. bis 16. III. 09	10 A.E.	11. IV. 09	$\frac{1}{1150}$ A.E.	$\frac{1}{8825}$ ccm	0
			8. V. 09	$\frac{1}{2500}$ "	$\frac{1}{19750}$ "	0
			4. VI. 09	$\frac{1}{3600}$ "	$\frac{1}{19250}$ "	0
			15. VII. 09	$\frac{1}{5000}$ "	$\frac{1}{27500}$ "	0
104	5. III. bis 12. III. 09	8,5 "	4. V. 09	$\frac{1}{8000}$ "	$\frac{1}{16500}$ "	0
			3. VI. 09	$\frac{1}{4500}$ "	$\frac{1}{24750}$ "	0
105	5. III. bis 12. III. 09	8,5 "	7. IV. 09	$\frac{1}{1200}$ "	$\frac{1}{6600}$ "	0
			4. V. 09	$\frac{1}{2000}$ "	$\frac{1}{11000}$ "	0
			3. VI. 09	$\frac{1}{8000}$ "	$\frac{1}{16500}$ "	0

In den Seris der indirekt mit Antitoxin gefütterten Schafe konnte niemals Pferdeserumeiweiß mit der Präzipitinreaktion nachgewiesen werden, trotzdem z. B. bei Schaf 107 die Serumabnahme bereits 4 Wochen nach der Verfütterung stattfand und trotzdem nach der Berechnung genügend Pferdeserumeiweiß in den Serumsorten vorhanden gewesen wäre, falls dem Antitoxingehalt der Gehalt an biologisch nachweisbarem Pferdeserumeiweiß entsprochen hätte. Wir weisen endlich darauf hin, daß zur Zeit der Serumprüfung mit Hilfe der Präzipitinreaktion der früher ermittelte Antitoxingehalt sich nicht wesentlich verändert hatte.

Es ist somit die überraschende Tatsache festgestellt, daß im Blutserum von Schafen, denen wir auf die verschiedenste Weise (subkutane Injektion, direkte oder indirekte Verfütterung) tetanusantitoxinhaltiges Pferdeserum einverleibt hatten, zwar das injizierte Antitoxin lange sich halten kann, daß aber einige Zeit nach der Injektion (ca. 5—6 Wochen) in einer großen Zahl von Fällen Pferdeserumeiweiß mit Hilfe der Präzipitinreaktion nicht mehr nachgewiesen werden kann, obwohl auf Grund des ermittelten Antitoxingehaltes nachweisbare Pferdeserumeiweißmengen in den Seris vorhanden sein müßten,

falls das Antitoxin noch an das biologisch nachweisbare Pferdeserumeiweiß geknüpft wäre.

Diese bei Schafen von mir gewonnenen Resultate stehen in Gegensatz zu den Ergebnissen ähnlicher früherer Versuche von Hamburger und seinen Mitarbeitern<sup>1)</sup>. Diese Autoren fanden bei subkutan mit tetanusantitoxinhaltigem Pferdeserum eingespritzten Menschen und Kaninchen im Blutserum der Versuchsindividuen einen weitgehenden Parallelismus im Gehalt an präzipitabler Substanz einerseits und Antitoxin andererseits. Offenbar ist die benutzte Tierart hier von ausschlaggebender Bedeutung. Darauf weist unter anderem auch die überraschend lange Haltbarkeit (6 Monate) des Antitoxins im Blutserum unserer Versuchsschafe hin.

### III. Schlußfolgerungen.

Die von mir beschriebenen Tatsachen sind um so auffallender, als wir aus zahlreichen Versuchen die enge Verknüpfung der antitoxischen Funktion mit dem genuinen Serumeiweiß kennen; fast jeder Versuch der Gewinnung konzentrierterer, d. h. antitoxinreicherer und dabei doch nicht eiweißreicherer Antitoxinlösungen war ja bisher ohne durchgreifenden praktischen Erfolg und alle die Versuche gar, die eine völlige Trennung der antitoxischen Substanz von dem Bluteiweiß beweisen wollten, haben sich nicht als stichhaltig erwiesen.

Die in der vorstehenden Arbeit mitgeteilten Tatsachen zwingen aber zweifellos zu der Schlußfolgerung, daß das antitoxische Blutserum von Schafen, die in der bezeichneten Weise mit antitoxinhaltigem Pferdeserum behandelt sind, nicht einfach einem Schafserum entspricht, dem in vitro die entsprechenden Antitoxinmengen zugemischt sind. Das mit Hilfe der Präzipitinreaktion nachweisbare Pferdeserumeiweiß findet sich in jenem Serum entweder überhaupt nicht mehr vor oder in einer Form, daß die benutzte Methode trotz ihrer Feinheit negative Ergebnisse zeitigt.

1) Hamburger und verschiedene Mitarbeiter, Wiener klin. Wochenschrift, 1903, No. 15; 1904, No. 16, 29, 31; 1905, No. 50, und 1907, No. 27.

Angesichts dieser Beobachtungen drängt sich uns zunächst die Vermutung auf, daß vielleicht die Passage des Pferdeantitoxins durch den Schaforganismus zu einer Trennung des Antitoxins von dem Pferdeeweiß führt. Diese Hypothese ist indes so kühn und widerspricht so sehr allen bisherigen Erfahrungen, daß wir erst nach anderen Erklärungsmöglichkeiten uns umsehen müssen. In einer früheren Arbeit hatte ich bereits in Gemeinschaft mit Much auf die Möglichkeit hingewiesen, daß das antitoxische Pferdeserumeiweiß sich unter den bezeichneten Bedingungen zwar als solches erhält, aber aus noch nicht näher geklärten Gründen seine Reaktionsfähigkeit mit einem präzipitierenden Pferdeantiserum verloren hat. In ihrer eingangs zitierten Arbeit berichten Landsteiner und Prasek über Untersuchungen, die sich in ganz ähnlicher Richtung bewegten. Die genannten Autoren konnten feststellen, daß es möglich ist, einem Antikörper (Agglutinin) enthaltenden Serum seine Fällbarkeit durch spezifisches Präzipitin zu nehmen, ohne die Antikörperwirkung aufzuheben. Es gelang das durch Vermischung verdünnten hochwertigen Typhusagglutinins, stammend vom Pferde, mit normalem Schafserum. Insbesondere beim Erwärmen dieser Mischung verlor das Pferdeeweiß unter Beibehaltung seiner Antikörperwirkung seine Reaktionsfähigkeit mit wirksamem Pferdeantiserum. Landsteiner und Prasek nehmen an, daß beim Erwärmen der Mischungen die Eiweißteilchen der beiden verschiedenen Sera durch Adsorption sich zu größeren Komplexen zusammenlagern, die nicht mehr auf spezifisches Präzipitin reagieren. Sie stellen sich vor, daß im Tierkörper derartige Veränderungen vielleicht noch leichter vor sich gehen als bei Versuchen in vitro. Wenn wir nun weiter beachten, daß ein Teil der genannten Versuche Landsteiners und Praseks Mischungen von antikörperhaltigem Pferdeserum und Schafserum betreffen, also die gleichen Serumarten, die wir für unsere Versuche in vivo verwandten, so können wir uns in der Tat vorstellen, daß das den Schafen eingespritzte Pferdeserum entsprechend den Vorstellungen Landsteiners und Praseks infolge von kolloidalen Adsorptionsvorgängen mit dem Eiweiß des Schafblutes sich dem Nachweis durch Präzipitin entzieht. Dagegen spricht mir

aber, daß diese Veränderung im Tierkörper allmählich erfolgt; denn in den ersten Wochen nach der Serumeinspritzung ist in der Regel die Präzipitinreaktion mit hochwertigem Pferdeantiserum unter den beschriebenen Bedingungen positiv. Ueberhaupt ist, wie auch Doerr und Pick hervorheben, es ja unbewiesen, daß bei Versuchen in vivo die Verhältnisse ebenso oder ähnlich liegen wie bei den Landsteiner-Prasekschen Reagenzglasversuchen.

Zur Erklärung der von mir beobachteten Tatsachen möchte ich daher mehr einer von Doerr und Pick vertretenen Auffassung zuneigen. Gelegentlich ihrer zu anderem Zweck angestellten Untersuchungen fanden diese Autoren, daß bei Kaninchen, denen Choleravibrionen agglutinierendes Pferdeserum eingespritzt worden war, die Abnahme des eingespritzten Antikörpers auf der einen Seite und des präzipitablen Pferdeserumeiweißes auf der anderen Seite nicht genau parallel erfolgt. Sie ziehen daraus die Schlußfolgerung, daß die Agglutinine nicht mit der gesamten präzipitablen Substanz des Serums identisch sind. Zu demselben Schluß waren übrigens schon früher in meines Erachtens hochwichtigen Reagenzglasuntersuchungen Landsteiner und Prasek gelangt. Durch Absättigung von typhusagglutinhaltigem Pferdeserum mit Typhusbacillen gelang es, den Agglutiningehalt der betreffenden Sera ganz beträchtlich zu vermindern (z. B. um 75 Proz.), während der Eiweißgehalt dadurch sich nur minimal (2 Proz.) verminderte. Danach müssen die spezifischen Agglutinine, die zweifellos am Eiweiß des Serums haften, nur einen geringen Teil des Gesamteiweißes in den Immunseris ausmachen.

In Anlehnung an diese gut begründete Vorstellung, komme ich für die Aufklärung meiner oben beschriebenen Antitoxinversuche zu dem Wahrscheinlichkeitsschluß, daß nach der Injektion von antitoxischem Pferdeserum bei Schafen zuerst in der Regel der mit einem spezifischen präzipitierenden Pferdeantiserum nachweisbare Teil des Pferdeserumeiweißes (sogenannte präzipitable Substanz) verschwindet, während derjenige Eiweißanteil, welcher zugleich Träger der antitoxischen

Funktion ist, sich viel länger halten kann. Die präzipitable Substanz verschwindet meist in 5—7 Wochen, das Antitoxin kann sich dagegen gelegentlich bis zu 6 Monaten halten. Selbst unter Berücksichtigung der Tatsache, daß die Antitoxinbestimmung den Nachweis eines viel geringeren Quantum von Pferdeserum erlaubt als die Präzipitinreaktion, besteht die Behauptung von dem rascheren Verschwinden des präzipitablen Pferdeserumeiweißes zu Recht; denn auch da, wo eine einfache Umrechnung aus dem Antitoxingehalt der untersuchten Schafserumproben auf den Gehalt an Pferdeserum bzw. Pferdeeiweiß ergibt, daß die Präzipitinreaktion positiv sein müßte, fällt sie negativ aus. Ein derartig antitoxisch gemachtes Schafserum entspricht eben, wie noch einmal hervorgehoben sein mag, nicht einfach einer in vitro auf den gleichen Antitoxingehalt gebrachten Verdünnung des Pferdeantitoxins in Schafserum.

Auf Grund aller dieser sowohl die Agglutinine (Landsteiner und Prasek, Doerr und Pick), wie die Antitoxine (Römer) betreffenden Untersuchungen, ist ohne Zweifel zum mindesten theoretisch das Bestreben berechtigt, aus antikörperhaltigen Seris durch Eliminierung unwirksamen oder wenigstens wenig wirksamen Eiweißes eiweißärmere und gleichwohl nicht antikörperärmere Lösungen zu gewinnen. Die große praktische Bedeutung derartiger konzentrierterer Antikörperlösungen, insbesondere antitoxischer Präparate, mit nicht erhöhtem, wenn möglich vermindertem Eiweißgehalt ist namentlich unter Berücksichtigung des viel diskutierten Serum-anaphylaxieproblems ohne weiteres einzusehen.

Noch an eine dritte Erklärungsmöglichkeit kann gedacht werden: Auf die Einverleibung des Pferdeserums bildet sich im Organismus der Schafe wie auch bei anderen Tierarten spezifisches Präzipitin, vielleicht aber in so geringen Mengen, daß es nicht im Ueberschuß und frei im Blutserum erscheint, sondern lediglich gebunden an die im Blute kreisenden präzipitablen Substanzen des Pferdeeiweißes. Diese ihrerseits verlieren hierdurch ihre Fällbarkeit durch spezifisches Pferdeantiserum, bleiben aber antitoxisch wirksam, da die antitoxische Kraft sozusagen nur äußerlich an der Verbindung präzipitabler Substanz + Präzipitin haftet. Wir müssen dann

allerdings noch die weitere Vorstellung zu Hilfe nehmen, daß diese Verbindung nicht, wie sonst üblich, einem weiteren Abbau anheimfällt. Da mir indes diese Erklärung recht gekünstelt erscheint, neige ich vorläufig mehr der zweiten von den oben angegebenen Erklärungsmöglichkeiten zu.

### Zusammenfassung.

1) In der Milch von Schafen, die subkutan mit tetanusantitoxinhaltigem Pferdeserum eingespritzt worden sind, erscheint das Antitoxin, während der Nachweis von Pferdeeiweiß mit Hilfe der Präzipitin- und Komplementbindungsreaktion versagen kann, auch dann, wenn auf Grund einer einfachen Umrechnung nach dem Antitoxingehalt genügende Mengen biologisch nachweisbaren Pferdeeweißes a priori in der Milch hätten vorhanden sein müssen.

2) Im Serum von Schafen, die auf die verschiedenste Weise mit tetanusantitoxinhaltigem Pferdeserum behandelt sind, kann sich das Antitoxin sehr lange (bis zu 6 Monaten) halten, während die mit Hilfe eines präzipitierenden Pferdeantiserums nachweisbare präzipitable Substanz viel rascher verschwindet. Diese Behauptung von dem rascheren Verschwinden der präzipitablen Substanz besteht zu Recht auch unter Berücksichtigung quantitativer Verhältnisse, d. h. der Tatsache, daß die Antitoxinmethode den Nachweis viel geringerer Mengen Pferdeserums unter den gegebenen Bedingungen erlaubt als die Präzipitinmethode.

3) Vermutlich erklären sich diese Tatsachen so, daß das Antitoxin nicht gleichmäßig über das ganze Serumeiweiß verteilt ist, sondern nur an gewissen — vielleicht sehr geringen — Teilen desselben haftet. Dieser antitoxische Pferdeeweißanteil hält sich im Serum von Schafen länger als der mit der Präzipitinreaktion nachweisbare antitoxinfreie bzw. antitoxinarme Eiweißanteil (präzipitable Substanz). In die Milch säugender Schafe geht vorzugsweise der antitoxinhaltige Anteil des Pferdeserumeiweißes über.



*Nachdruck verboten.*

[Aus der Serologischen Abteilung des Hygienischen Institutes  
und der gynäkologischen Klinik der deutschen Universität Prag.]

### **Versuche über die Wirkungsweise des Streptokokkenserums.**

Von Prof. Dr. Oskar Bail und Prof. Dr. F. Klein hans.

(Eingegangen bei der Redaktion am 24. Februar 1912.)

In einer vorhergehenden Abhandlung über die Infektiosität des Streptococcus<sup>1)</sup> konnte gezeigt werden, daß der Organismus des Meerschweinchens gegenüber dem benutzten Stamme (Streptococcus Aronson) so gut wie keine praktisch anwendbaren Schutzvorrichtungen besitzt. Das Serum ist wirkungslos und wird auch durch Zusatz eines hochwertigen, auf den Stamm eingestellten Immunserums, obwohl dieses nachweisbar Agglutinine besitzt und sich auf den Kokken fixieren läßt, nicht bakterizid. Auch die Kombination von aktivem Meerschweinchen-serum und Leukocyten vermag keine Abtötung oder auch nur Entwicklungshemmung der Kokken herbeizuführen. Gleichwohl besitzen die Leukocyten sehr gut bakterizid wirksame Stoffe, nur daß diese normalerweise aus den lebenden Leukocyten nicht herausgehen und zur Wirkung kommen können; erst wenn man eine Mischung von Serum und Zellen eingefrieren läßt, erhält man bakterizide Effekte sehr ansehnlicher Art, die der Hauptsache nach an die Zelltrümmer gebunden sind und nur zum Teil beim Gefrieren in das umgebende Medium extrahiert werden.

Dadurch ist bewiesen, daß die Leukocyten des Meerschweinchens zwar die Potenz zur Kokkenvernichtung haben, daß sie diese aber normalerweise nicht auszuüben imstande sind. Die Ursache liegt darin, daß sie die dafür nötigen Stoffe hartnäckig durch eine Art vitaler Retention in sich behalten und daß die Kokken nicht die nötige Affinität zu

1) Diese Zeitschr., Bd. 12, No. 2.

Zeitschr. f. Immunitätsforschung, Orig. Bd. XIII.

diesen haben, um sie aus den Leukocyten heraus an sich zu ziehen. Erst wenn die vitale Retention durch Abtötung der Zellen aufgehoben ist, genügt die Affinität, um eine aphagozide (Weil) Wirkung der Zellreste hervortreten zu lassen.

Unter solchen Umständen gibt es nur eine Möglichkeit der Kokkenvernichtung im normalen Organismus, die Phagocytose, durch welche die Bakterien direkt in den Wirkungsbereich der vital hartnäckig festgehaltenen Leukocytenstoffe hineingezogen werden. Nun findet diese aber bei den Kokken, die früher und auch in den nachfolgenden Untersuchungen ausschließlich benutzt wurden [Streptokokken aus dem Peritonealexsudate schwer infizierter Meerschweinchen<sup>1)</sup>], weder in vitro, noch im Tierkörper in nennenswertem Maße statt, so daß die Möglichkeit einer Vernichtung der in die Bauchhöhle eingeführten Kokken nur eine sehr geringe ist.

Das ändert sich bei Verwendung eines geeigneten Immunserums, als welches früher, wie jetzt, das von Aronson bei Schering hergestellte käufliche Serum verwendet wurde. Mischt man dieses einer Leukocytenaufschwemmung in Serum bei, so kann man auf der Platte sofort sehr ansehnliche Keimvernichtung feststellen und der Tierversuch wie der opsonische Präparatversuch im Glase lehren, daß mit der Anwendung des Immunserums stets Phagocytose einhergeht: das Aronsonsche Serum stellt somit ein bakteriotropes Serum in reiner Form (Neufeld und Rimpau) dar.

Daß die Phagocytose mit einer wirklichen Abtötung der lebend aufgenommenen Kokken verbunden ist, beweist der Plattenversuch aufs klarste und durch diesen erhält man auch Aufschluß über die Art der Wirkung eines solchen bakteriotropen Serums. Die Wirkung der lebenden Leukocyten mit Immunserum zusammen ist nämlich nicht größer wie die der gefrorenen ohne solches, und so günstig der Zusatz von Immunserum zu lebenden Zellen ist, deren Wirkung er erst ermöglicht, so

1) Bei allen Streptokokkenversuchen ist nicht nur der benutzte Stamm, sondern auch der jeweilige Zustand der verwendeten Kokken zu beachten. Es bedingt sowohl im Tier- wie im Glasversuche sehr bedeutende Unterschiede, ob man mit Kultur oder Tierbacillen und mit diesen wieder im frischen oder älteren Zustande experimentiert. Der Einfluß des Alters war übrigens bereits Bordet (Ann. de l'Inst. Pasteur, 1897) genau bekannt.

bedeutungslos ist er für den bakteriziden Effekt der abgetöteten Leukocyten. Denn eine gefrorene Mischung von Leukocyten und Serum wird durch Zusatz von Immunserum nicht stärker keimtötend, als sie es ohne einen solchen ist.

Daraus geht für die Beurteilung der Wirkung der bakteriotropen Seren die wichtige Tatsache hervor, daß sie kein eigentlich neues keimschädliches Moment in den Organismus hineinbringen, wie dies die rein bakteriolytischen Seren tun, sondern nur die Wirkung schon normal vorhandener keimfeindlicher Kräfte ermöglichen, die sonst, offenbar infolge besonderer Zustände und Wirkungen der betreffenden Mikroorganismen, nicht zur Geltung kommen können.

Weiter wurde festgestellt, daß bei einer erfolgreichen Infektion eines Meerschweinchens Stoffe im Tierkörper entstehen, die der Wirkung des Immunserums direkt entgegenwirken. Es ließ sich zeigen, daß das von den Kokken befreite Exsudat intraperitoneal infizierter Tiere, die Fähigkeit hat, die Wirkung des Immunserums auf Leukocyten in quantitativer Weise aufzuheben. Diese als aggressiv zu bezeichnende Wirkung läßt sich sowohl im Plattenversuch, wie an der Phagocytose erkennen.

Der genaueren Untersuchung dieser Verhältnisse gelten die folgenden Untersuchungen, deren Technik sich im allgemeinen eng an die schon früher beschriebene anlehnt und bei den Versuchsmitteilungen selbst noch genauer geschildert wird.

Die ersten Versuche hatten, außer der Nachprüfung der früher mitgeteilten Ergebnisse, der Beantwortung zweier Fragen zu dienen. Daß aggressive Exsudate die mögliche Bakterizidie von Zell-Immunserummischungen aufheben, war bekannt; es sollte nun genauer als bisher festgestellt werden, ob auch die schon normalerweise vorhandene Bakterizidie gefrorener Zellen durch Aggressin aufgehoben wird, ob sich also eine direkt antagonistische Wirkung zwischen den vom Coccus stammenden aggressiven und den aus den Leukocyten stammenden bakteriziden Stoffen nachweisen läßt und weiter, ob Immunserum etwa hierauf von irgendwelchem Einflusse ist.

Tabelle I.

Ein kleines Meerschweinchen von 200 g wird mit 2 ccm einer frischen, aber seit zwei Monaten nicht durch ein Tier geschickten Bouillonkultur von *Streptococcus Aronson* intraperitoneal infiziert und stirbt in der Nacht. Es liefert ca. 5 ccm eines dicht trüben Exsudates im Peritoneum mit dicht gedrängt liegenden Kokken, meist einzeln und als Diplokokken, seltener als kurze Ketten. In diesen erscheinen die Einzelglieder etwas größer und zeigen einen deutlichen gefärbten Saum, von dem bei den Einzelkokken nichts zu sehen ist. Leukocyten sind nicht zahlreich, höchst selten mit Phagocytose. Netzpräparate zeigen neben großen Kokkenmengen reichlich Zellen, von denen Makrophagen lebhaft phagocytieren, während die kleinen polynukleären dies nicht tun. In beiden Pleuren zusammen etwa 1 ccm viel weniger trübes Exsudat, im wesentlichen mit dem gleichen Befunde wie im Peritoneum. Im Herzblute schon mikroskopisch zahlreiche Kokken. Das Exsudat wird sorgfältig bis zur vollständigen Klarheit zentrifugiert und dann  $\frac{1}{2}$  Stunde bei 56–58° erwärmt. Es ist danach in 0,4 ccm steril.

Leukocyten und normale Exsudatflüssigkeit wurden von einem großen Meerschweinchen gewonnen, das 16 Stunden vor dem Verbluten eine intraperitoneale Injektion von 25 ccm Bouillon erhalten hatte. Für diesen und alle folgenden Versuche wurde das oft in großer Menge vorhandene Exsudat mit steriler Pipette entnommen und zentrifugiert. Ueberdies wurde die Bauchhöhle dann noch mit Kochsalzlösung ausgespült und die Zellen ebenfalls auf der Zentrifuge isoliert. Sämtliche Leukocyten wurden sodann in ca. 20 ccm Kochsalzlösung in einer einzigen, vorher genau austarierten Eprouvette gesammelt und zentrifugiert. Der durch Abgießen von der überstehenden Flüssigkeit befreite Zellsatz wurde sodann gewogen. Im gegenwärtigen Versuche wog er 1,2 g. Er wurde in 24 ccm Kochsalzlösung verteilt und zu je 2 ccm in die Versuchseprouvetten gefüllt; durch abermaliges Zentrifugieren wurden so in jeder Probe 0,1 g Leukocyten isoliert, welche dann in den Versuchsfüssigkeiten verteilt wurden. Die Menge von 0,1 g Zellen wurde für alle Versuche beibehalten. Irgend stärker bluthaltige Exsudate soll man nicht verwenden. — In jede der Proben erfolgte eine Einsaat von 312 Kokken aus dem Peritonealexsudate des infizierten Meerschweinchens. Nach 4-stündigem Aufenthalte im Brutschrank, während dessen die Versuchseprouvetten öfters geschüttelt wurden, wurde ihr Gesamtinhalt mit Agar vermischt und zu Platten verarbeitet.

	Nach 4 Std.
1) 0,3 ccm Ser. aktiv + 0,2 ccm Normalexsudatfl. 56°	670
2) 0,3 " " + " " + Lyten	11 000
3) Wie No. 2, aber die Mischung 3mal eingefroren	0
4) 0,3 ccm Ser. aktiv + 0,15 ccm Exsudatfl. 56° + 0,05 ccm Aggressin 56°	8 600
5) Wie No. 4, mit Leukocyten	ca. 40 000
6) Wie No. 5, aber die Mischung gefroren	0
7) 0,3 ccm Serum aktiv + 0,2 ccm Aggressin 56°	47 000
8) Wie No. 7, mit Leukocyten	50 000
9) Wie No. 8, aber die Mischung gefroren	0

		Nach 4 Std.
10) Wie No. 1		1 280 Z
11) " " 2		0
12) " " 3		0
13) " " 4		11 000 Z
14) " " 5	mit Zusatz von 0,001 ccm Immunserum	4 880
15) " " 6		0
16) " " 7		40 000
17) " " 8		26 000
18) " " 9		0

Tabelle II.

Anordnung ganz analog der im vorigen Versuche. Das Aggressin und die zur Einsaat benutzten Kokken entstammen einem mit 3 ccm Bouillonkultur, die direkt aus dem Herzblute des vorigen Meerschweinchens gezüchtet war, intraperitoneal infizierten, nach 9 Stunden in Agone verbluteten Tiere. Zur Einsaat gelangen 816 Kokken in jede Probe.

		Nach 4 Std.
1) 0,35 ccm Serum aktiv + 0,15 ccm Exsudatflüssigkeit 56°		1 536
2) Wie No. 1, mit Leukocyten		11 700
3) Wie No. 2, aber die Mischung gefroren		0
4) 0,35 ccm Ser. aktiv + 0,1 ccm Exsudatfl. 56° + 0,025 ccm Aggressin 56°		3 248
5) Wie No. 2, mit Leukocyten		14 200
6) Wie No. 5, aber die Mischung gefroren		0
7) 0,35 ccm Serum aktiv + 0,15 ccm Aggressin 56°		12 000
8) Wie No. 7, mit Leukocyten		15 000
9) Wie No. 8, aber die Mischung gefroren		0
10) 0,2 ccm Serum aktiv + 0,3 ccm Aggressin 56°		ca. 40 000
11) Wie No. 10, mit Leukocyten		15 100
12) Wie No. 11, aber die Mischung gefroren		4 920
13) Wie No. 1		2 640 Z
14) " " 2		0
15) " " 3		0
16) " " 4		2 224 Z
17) " " 5	mit 0,0005 ccm Immunserum	13 000
18) " " 6		0
19) " " 7		7 000 Z
20) " " 8		15 200
21) " " 9		0

Wenn man von den durch die etwas wechselnde Versuchsanordnung bedingten quantitativen Differenzen absieht, stimmen beide Versuche vollkommen überein. Bei den geringen, hier angewendeten Einsaatgrößen bemerkt man eine gewisse Wirkung des Normalserums, die zwar nie zu einer wirklichen Abtötung führt, immerhin aber als Entwicklungshemmung bezeichnet werden muß. Bei größeren Einsaaten ist von ihr nichts zu bemerken, sie entspricht aber wahrscheinlich jener Entwicklungshemmung, die man auch beim intraperitonealen Meerschweinchenversuche an den in geringer Zahl eingespritzten Kokken in

der allerersten Zeit der Infektion, bei noch sehr geringem Leukocyten-Zellgehalte beobachten kann. Zusatz von Immuns serum bringt hier keine Verstärkung, eher das Gegenteil, besonders wenn man die agglutinierende Wirkung desselben beachtet, auf die schon in der ersten Mitteilung hingewiesen wurde und die im Aussehen der Kolonien (durch ein Z in den Tabellen gekennzeichnet) zu erkennen ist. Auch der Zusatz von lebenden Leukocyten zu Normalserum erzeugt eher das Gegenteil von Keimvernichtung und die Zahl der Versuche ist bereits groß, wo dieser Zusatz deutlich zu einer Begünstigung der Kokkenvermehrung Anlaß gab.

Im geraden Gegensatze dazu stehen die Resultate, die man erhält, sobald man die an sich ganz unwirksame Zells erummischung vor der Einsaat nach der Buchnerschen Methode 3mal eingefrieren und wieder auftauen läßt. Die augenblicklich und so stark, wie dies bei Streptokokken überhaupt möglich ist, einsetzende Keimvernichtung beweist klar, daß die Leukocyten die Stoffe zur Abtötung in relativ hoher Konzentration enthalten müssen; es sind die einzigen, die sich im Meerschweinchenorganismus bisher haben auffinden lassen. Normalerweise (d. h. im Tier) kommen sie aber nicht zur Wirkung, sondern erst unter dem Einflusse des Immuns erums und, wie die mikroskopische Untersuchung lehrt, der dabei stattfindenden Phagocytose. Solange die Leukocyten leben, halten sie ihre bakteriziden Substanzen vital hartnäckig zurück und betätigen sie erst an den Kokken, die sie in ihr Inneres aufgenommen haben.

Gegen diese Immuns erumwirkung richten sich aber Stoffe, die während der Infektion im Tierkörper, offenbar im unmittelbaren Zusammenhange mit dem Wachstum der Kokken entstehen, die Aggressine des Streptococcus, die sich aus dem Peritonealexsudate leicht gewinnen lassen. Ein Blick auf Tabelle I genügt, um zu zeigen, daß die gegenseitige Beeinflussung von Immuns erum und Aggressin eine quantitative ist, daß das Immuns erum um so weniger zur Wirkung kommt, je mehr Aggressin zugegen ist und umgekehrt. Ganz abgesehen von dem theoretischen Interesse dieser Feststellung, besitzt sie auch eine wichtige praktische Bedeutung, die klar hervortritt, sobald man sich die Verhältnisse eines Heil-

versuches mit Immunserum, z. B. in einer peritonitischen Bauchhöhle vorstellt. Um die daselbst gewachsenen Kokken mit Hilfe der ebenfalls stets vorhandenen Leukocyten intra- oder extracellulär zu vernichten, würde eine relativ geringe Menge von Immunserum ausreichen. Tatsächlich muß aber diese viel höher genommen werden, da zunächst erst die ungünstige Wirkung des Aggressins beseitigt sein muß, ehe das Serum die Kokken überhaupt beeinflussen kann. Denn wie groß oder gering man auch die Bedeutung der Aggressine für die Infektion veranschlagen will; daß sich während der Infektion solche Exsudate bilden, lehrt der Augenschein und ihre die Infektion begünstigenden, die Heilung erschwerenden Eigenschaften müssen ja im Tier, eventuell im Menschenkörper zur Geltung gekommen sein.

Die beiden mitgeteilten Versuche lehren aber weiter mit voller Deutlichkeit, daß die Aggressinwirkung sich nicht gegen die in den Leukocyten enthaltenen bakteriziden Stoffe selbst richtet: sind diese durch Gefrieren der Zellen und damit Aufhebung ihrer vitalen Retention zugänglich geworden, so ist das Aggressin auf sie ohne Einfluß.

Es tritt also hier etwas ganz Aehnliches auf, wie bei analogen Reagenzglasversuchen mit Milzbrandaggressin<sup>1)</sup>, wo nur die von lebenden Leukocyten ohne Phagocytose ausgehende Keimvernichtung durch Aggressin aufgehoben oder beeinträchtigt wird, nicht aber die in den Zellen tätigen keimfeindlichen Stoffe selbst geschädigt werden; hier wie dort richtet sich die Aggressivität in erster Linie gegen eine Betätigung der Vitalität der Zellen.

Beim Streptococcus Aronson ist diese Wirkung leicht in einer Beeinträchtigung der Phagocytose zu erkennen, womit auch das Fehlen der Abtötung im Plattenversuch einhergeht: der infektiöse Coccus wird bei Gegenwart entsprechender Mengen seines Aggressins trotz Anwesenheit von hochwertigem Immunserum auf dem Zustande der Nichtphagocytierbarkeit erhalten, den er ohne Serum ohnedies besitzt.

Die quantitativ gesetzmäßige Gegenwirkung von Aggressin und Immunserum ließ natürlich von vornherein an eine direkte

1) Bail und Weil, Arch. f. Hyg., Bd. 73.

Beeinflussung beider denken. Die diesbezüglichen Versuche ergaben aber zunächst Resultate, die auf eine ganz andere Art des Antagonismus hinzudeuten schienen. Sie sind lehrreich genug, um Anführung zu verdienen.

Zunächst war schon frühzeitig festgestellt worden, daß, wie schon seit Neufeld und Rimpau bekannt, die Kokken das Immunserum auf sich fixieren und dadurch gewissermaßen für die Zellphagocytose sensibilisiert werden. Solche Kokken unterliegen dann auch der Zellbakterizidie im Reagenzglase, wobei allerdings zu bemerken ist, daß die Sensibilisierung hier keineswegs so leicht und anscheinend vollständig erfolgt, wie etwa die Besetzung eines Choleravibrio mit dem zugehörigen bakteriolytischen Immunkörper. Sind aber die Kokken einmal sensibilisiert, so unterliegen sie trotz Anwesenheit von Aggressin der Zellwirkung. Die zu diesem Zwecke angestellten Versuche eigens anzuführen, erscheint nicht nötig, da aus den später mitzuteilenden das gleiche hervorgehen wird. Es lag nun nahe, zu untersuchen, ob bei Anwesenheit von Aggressin dennoch eine Sensibilisierung von Kokken durch das Immunserum erfolge.

Tabelle III.

Verwendet werden außer der normalen Exsudatflüssigkeit eines mit Bouillon vorbehandelten Meerschweinchens die durch Zentrifugieren und  $\frac{1}{4}$ -stündige Erwärmung auf  $56^{\circ}$  steril gewordenen Exsudate zweier mit Str. Aronson tödlich intraperitoneal infizierter Tiere. Diese werden mit Immunserum in folgender Weise gemischt:

I.	1,5 ccm Normalexsudatflüssigkeit $56^{\circ}$	
II.	"	+ 0,02 ccm Immunserum
III.	"	+ 0,2 "
IV.	" Aggressin a $56^{\circ}$	+ 0,02 ccm Immunserum
V.	"	+ 0,2 "
VI.	" Aggressin b $56^{\circ}$	+ 0,02 "
VII.	"	+ 0,2 "

Zu allen Proben wurden 3 Tropfen einer stark trüben Emulsion der Kokken aus dem Exsudate eines tödlich infizierten Meerschweinchens zugesetzt und die Mischungen ca. 14 Stunden im Eisschrank aufbewahrt. Nach dieser Zeit war No.-I gleichmäßig trüb, alle anderen Proben waren mehr oder weniger klar, mit Bodensätzen. Die mikroskopische Untersuchung ergab in I gleichmäßig verteilte, überall sonst agglutinierte Kokken, oft in sehr großen Haufen, welche in V und VII in einer mattgefärbten Grundsubstanz eingebettet erschienen (Präzipitation?). Die Proben wurden einmal mit Kochsalzlösung gewaschen, in ebensolcher aufgeschwemmt und stark verdünnt zur Einsaat verwendet.



A. Einsaat I = 5280.				nach 4 Stunden
1)	0,35 ccm Serum akt.	+ 0,05 ccm Exsudatfl. 56°		ca. 50 000
2)	dgl.	+	„ „ + Lyten	ca. 100 000
3)	„	+	„ Aggressin b 56° + Lyten	ca. 70 000
4)	„	+	„ „ + Lyten	ca. 100 000
5)	„	+	„ Exsudatfl. + 0,001 ccm I.-Ser.	ca. 40 000 Z
6)	„	+	„ + dgl. + Lyten	2 600
7)	„	+	„ Aggressin + 0,001 ccm I.-Ser.	ca. 80 000
8)	„	+	„ + dgl. + Lyten	ca. 30 000 Z
B. Einsaat II = 464.				
1)	0,35 ccm Serum akt.	+ 0,05 ccm Exsudatfl. 56°	+ Lyten	5 800
2)	dgl.	+ 0,05 ccm Aggressin 56°	+ Lyten	9 000
C. Einsaat III = 992.				
1)	0,35 ccm Serum akt.	+ 0,05 ccm Exsudatfl. 56°	+ Lyten	2 400
2)	dgl.	+ 0,05 ccm Aggressin 56°	+ Lyten	1 680
D. Einsaat IV = 1448.				
1)	0,35 ccm Serum akt.	+ 0,05 ccm Exsudatfl. 56°	+ Lyten	6 700
2)	dgl.	+ 0,05 ccm Aggressin 56°	+ Lyten	3 600
E. Einsaat V = 224.				
1)	0,35 ccm Serum akt.	+ 0,05 ccm Exsudatfl. 56°	+ Lyten	496
2)	dgl.	+ 0,05 ccm Aggressin 56°	+ Lyten	120
F. Einsaat VI = 4368.				
1)	0,35 ccm Serum akt.	+ 0,05 ccm Exsudatfl. 56°	+ Lyten	16 000
2)	dgl.	+ 0,05 ccm Aggressin 56°	+ Lyten	23 000
G. Einsaat VII = 1264.				
1)	0,35 ccm Serum akt.	+ 0,05 ccm Exsudatfl. 56°	+ Lyten	212
2)	dgl.	+ 0,05 ccm Aggressin 56°	+ Lyten	480

Tabelle IV.

Anordnung wie im vorigen Versuche. Es werden folgende Proben hergestellt und mit je 5 Tropfen einer trüben Kokkenaufschwemmung aus dem Peritonealexsudate desselben infizierten Meerschweinchens, welches das Aggressin geliefert hatte, besät:

I. 2 ccm Exsudatflüssigkeit			
II.	„	„	+ 0,05 ccm Immunserum
III.	„	„	+ 0,25 „ „
IV.	„	Aggressin 56°	+ 0,05 „ „
V.	„	„	+ 0,25 „ „

Nach ca. 14-stündigem Aufenthalte im Eiskasten zeigen sich die Proben II—V geklärt und agglutiniert, wobei die starke Satzbildung in V (Präzipitation) auffällt. Der Kokkensatz wird einmal gewaschen, in viel Kochsalzlösung aufgenommen und verteilt und zur Einsaat benutzt.

A. Einsaat I = 125.				
1)	0,4 ccm Serum akt.	+ 0,1 ccm Exsudatfl. 56°		} Intensive Vermehrung
2)	dgl.	+ „ „	+ Lyten	
3)	„	+ „ Aggressin		
4)	„	+ „ „	+ Lyten	
5)	Wie 1—4 mit je 0,001 ccm Immunserum			} ca. 20 000 Z 2 160 ca. 30 000 „ 30 000
6)				
7)				
8)				

## B. Einsaat II = 824.

1)	0,4 ccm Serum akt.	+ 0,1 ccm Exsudatfl. 56°		ca. 40 000
2)	dgl.	+	" " + Lyten	8 200
3)	"	+	" Aggressin	ca. 40 000
4)	"	+	" " + Lyten	1 736

## C. Einsaat III = 4240.

1)	0,4 ccm Serum akt.	+ 0,1 ccm Exsudatfl. 56°		ca. 40 000
2)	dgl.	+	" " + Lyten	5 700
3)	"	+	" Aggressin	ca. 40 000
4)	"	+	" " + Lyten	4 900

## D. Einsaat IV = 4888.

1)	0,4 ccm Serum akt.	+ 0,1 ccm Exsudatfl. 56°		ca. 40 000
2)	dgl.	+	" " + Lyten	8 900
3)	"	+	" Aggressin	ca. 40 000
4)	"	+	" " + Lyten	7 200

## E. Einsaat V = 5360.

1)	0,4 ccm Serum akt.	+ 0,1 ccm Exsudatfl. 56°		ca. 40 000
2)	dgl.	+	" " + Lyten	3 300
3)	"	+	" Aggressin	ca. 40 000
4)	"	+	" " + Lyten	1 120

Tabelle V.

Anordnung wie in den vorigen Versuchen. Hergestellt werden:

I.	2,5 ccm Exsudatflüssigkeit 56°		
II.	" "	+ 0,01 ccm Immunserum	
III.	" "	+ 0,1 " "	
IV.	" Aggressin 56°	+ 0,01 " "	
V.	" "	+ 0,1 " "	

Nach Zusatz von 5 Tropfen trüber Aufschwemmung von Streptokokken aus dem Peritonealexsudate des gleichen Tieres, welches das Aggressin geliefert hatte, kommen alle Proben auf ca. 12 Stunden in den Eisschrank. Außer in I ist überall Agglutination eingetreten, schwach und unvollständig in II und IV, sehr stark in III und V. Die Kokken werden abzentrifugiert, gewaschen und in viel Kochsalzlösung verteilt, zur Einsaat verwendet.

## A. Einsaat I = 3400.

1)	0,4 ccm Serum akt.	+ 0,1 ccm Exsudatfl. 56°			
2)	dgl.	+	"	+ Lyten	} Ueberall Vermehrung
3)	"	+	" Aggressin		
4)	"	+	"	+ Lyten	
5)	} Wie 1—4 mit je 0,001 ccm Immunserum				
6)					14 900 Z
7)					1 360
8)					26 000
					ca. 40 000

## B. Einsaat II = 6800.

1)	} Wie 1—4 bei Einsaat I			
2)				
3)				
4)				
				14 000 Z
				21 000
				28 000
				30 000

C. Einsaat III = 3100.			
1) )	Wie 1—4 bei Einsaat I	{	24 000
2) )			3 200
3) )			30 000
4) )			992
D. Einsaat IV = 610.			
1) )	Wie 1—4 bei Einsaat I.	{	29 000
2) )			41 000
3) )			30 000
4) )			über 30 000
E. Einsaat V = 490.			
1) )	Wie 1—4 bei Einsaat I.	{	ca. 30 000
2) )			1 500
3) )			über 20 000
4) )			1 328

Anscheinend ganz eindeutig sprechen die Versuche in dem Sinne, daß eine direkte Beeinflussung des Aggressins durch das zugehörige Immunserum nicht erfolgt, da sonst eine Sensibilisierung der Kokken nicht eintreten dürfte. Tatsächlich war sie aber in den mitgeteilten und zahlreichen anderen nach der gleichen Methode angestellten Versuchen gerade so gut in Aggressin wie in der inaktivierten normalen Exsudatflüssigkeit eingetreten. Das erschien um so auffallender, als in eben diesen Versuchen die vorher erwähnte Erscheinung deutlich zu erkennen ist, daß Kokken, die einmal Immunserum aufgenommen haben, durch nachträglich zugesetztes Aggressin vor der Leukocytenbakterizidie geschützt sind. Daß die zum Versuche benützten aggressiven Exsudate wirksam waren, wurde jedesmal durch einen Versuch mit nicht sensibilisierten Kokken bewiesen, welche durch Leukocyten und Immunserum abgetötet wurden, aber ungehindert wuchsen, sobald mit dem Immunserum gleichzeitig Aggressin zugesetzt wurde.

Bei der Voraussetzung einer direkten gegenseitigen Beeinflussung von Immunserum und Aggressin bot die Erklärung der Leukocytenbakterizidie trotz Anwesenheit von Aggressin bei vorher sensibilisierten Kokken insofern keine Schwierigkeit, als man leicht annehmen konnte, daß das Immunserum zwar durch Aggressin an seinem Herantreten an die Kokken gehindert werde, daß es aber gegen das von ihnen bereits aufgenommene Immunserum wirkungslos sei.

In den mitgeteilten Versuchen sieht man aber, daß bei gleichzeitiger Anwesenheit von Kokken, Aggressin und Immun-

serum eine ganz deutliche Sensibilisierung stattgefunden hat, und zwar durch die gleichen Immunserummengen, die auch bei Verdünnung des Immunserums mit normaler Exsudatflüssigkeit notwendig sind. In der Tabelle V hatte 0,01 ccm Immunserum in keinem Falle ausgereicht, 0,05 ccm waren in Tabelle IV und 0,02 ccm in einem Teile der Tabelle III dazu sowohl in der aggressiven, wie in der normalen Körperflüssigkeit ausreichend gewesen. Nebenbei sei auf die aus den Tabellen ersichtliche Erscheinung hingewiesen, daß das Aggressin auch die Agglutination der Streptokokken nicht unterdrückt hatte.

Aber trotz dieser scheinbar ganz unzweideutigen und oft wiederholten Versuche wäre der Schluß, daß die Gegenwirkung zwischen Immunserum und Aggressin bei Anwesenheit von Leukocyten nicht auf einer direkten Beeinflussung beider beruhe, irrig gewesen, da sich eine solche bei geänderter Versuchsanordnung, deren quantitative Verhältnisse der des Mischungsversuches mehr angenähert waren, doch nachweisen ließ.

#### Tabelle VI.

Als Aggressin dient das durch Zentrifugieren und  $\frac{1}{4}$ -ständiges Erhitzen auf  $56-58^{\circ}$  vollkommen sterilisierte Peritonealexsudat eines schwer infizierten Meerschweinchens, dessen Kokken gleichzeitig zur Einsaat verwendet werden. Alle Proben wurden zunächst in zwei Teilen, a und b, angesetzt, so daß die Röhrchen der Reihe a 0,25, die der Reihe b 0,5 ccm Gesamtflüssigkeit enthielten. In jedes Röhrchen der Reihe b erfolgte die Einsaat von je einem Tropfen einer sehr stark verdünnten Kokkenaufschwemmung. Sodann wurden alle Proben auf 1 Stunde in den Brutschrank gestellt. Nach dieser Zeit wurde aus den Röhrchen der Reihe b (kokkenhaltig) je 0,25 ccm entnommen und zu den Röhrchen a zugesetzt. Der Rest der Flüssigkeiten b wurde zur Bestimmung der eingebrachten Keime mit Agar vermischt und zur Platte verarbeitet. Danach waren enthalten in 1b 1032, 2b 688, 3b 448, 4b 856, 5b 1240, 6b 696 Streptokokken. Nach weiterem 4-stündigen Aufenthalte bei  $37^{\circ}$  wurden auch die fertig gestellten Proben zu Platten verarbeitet.

1a) Leukocyten + 0,25 ccm Serum akt.	
1b) 0,4 ccm Serum akt. + 0,1 ccm Aggressin $56^{\circ}$	38 000
2a) Leukocyten + 0,25 ccm Serum akt.	
2b) 0,4 ccm Serum akt. + 0,001 ccm Immunser. in 0,1 ccm Aggressin	26 000
3a) Leukocyten + 0,2 Serum akt. + 0,0005 ccm Immunserum	
3b) 0,4 ccm Serum akt. + 0,1 ccm Exsudatflüssigkeit $56^{\circ}$	124
4a) Leukocyten + 0,2 ccm Serum akt. + 0,0005 ccm Immunser.	
4b) 0,4 ccm Serum akt. + 0,1 ccm Aggressin $56^{\circ}$	35 600

5a) Leukocyten + 0,2 ccm Serum akt. + 0,05 ccm Aggressin	
5b) 0,4 ccm Serum akt. + 0,001 ccm Immunserum	3 408
6a) Lyten + 0,15 Serum akt. + 0,05 ccm Aggressin + 0,0005 ccm Immunserum	
6b) 0,5 ccm Serum akt.	22 000

Die Versuchsanordnung ist so gewählt, daß die korrespondierenden Proben stets genau die gleichen reagierenden Flüssigkeiten und Zellen enthalten. Nur insofern besteht in diesem Versuche noch eine geringfügige, jedenfalls bedeutungslose Divergenz, als die Immunserumverdünnungen, mit Ausnahme der Probe 2b, mit Kochsalzlösung hergestellt waren. Was differiert, ist lediglich die Einwirkungsdauer der Versuchsfüssigkeiten auf die Kokken. So konnte z. B. das Immunserum in Probe 5b isoliert auf diese wirken, ehe Leukocyten dazu kamen, in 2b wirkte es gleichzeitig mit Aggressin zusammen; in 3a waren die Leukocyten mit Immunserum beisammen, ehe noch die Kokken eingesät wurden, in 5a standen die Leukocyten unter der Einwirkung des Aggressins, in 6a unter der des Aggressins zusammen mit Immunserum etc. Man sieht nun ganz deutlich, wie der Zusatz des Immunserums zu den isolierten Zellen, bei nachträglichem Zufügen des Aggressins + Kokken keine Bakterizidie zuläßt, die ohne Aggressin in hohem Grade möglich wäre (4a und b im Vergleich zu 3a und b). Läßt man hingegen das Aggressin auf die Zellen wirken, während die Kokken inzwischen unter dem Einflusse des Immunserums stehen (5a und b), so ist eine sehr deutliche Entwicklungshemmung zu konstatieren, entsprechend der früher konstatierten Tatsache, daß sensibilisierte Kokken durch Leukocyten trotz Anwesenheit von Aggressin beeinflußt werden. In der Probe 2b standen die Kokken unter dem gleichzeitigen Einflusse von Immunserum und Aggressin, also unter Verhältnissen, bei denen in Versuchen, wie denen der Tabellen III—V, Sensibilisierung eingetreten war und diese Kokken waren dann der Leukocytenwirkung nicht zugänglich. Es muß also doch eine direkte Beeinflussung des Immunserums durch Aggressin möglich sein, in dem Sinne, daß letzteres die Sensibilisierung der Kokken zu verhindern vermag.

Dieses Resultat erwies sich bei gleicher Versuchsanordnung später als ein konstantes.

Tabelle VII.

Aggressin und die zur Einsaat bestimmten Kokken stammen von dem gleichen, schwer infizierten Meerschweinchen. Anordnung analog der des Versuches der Tabelle VI, nur ist die Verdünnung des Immunserums mit aktivem Meerschweinchenserum durchgeführt. Wieder enthalten die Röhrchen der Reihe b, in welche die Kukkeneinsaat erfolgt, je 0,5 ccm Gesamtflüssigkeit, von welchen nach 1-stündigem Aufenthalte bei 37° je 0,25 ccm zu den entsprechenden Proben der Reihe a hinzugesetzt werden. Der Gehalt an Streptokokken betrug für je 0,25 ccm der Reihe b 7400, 8200, 5900, 10600, 11000, 10400 und 6300.

	4 Std. nach Mischung
1a) Lyten + 0,2 ccm Serum akt. + 0,05 ccm Exsudatfl. 56°	
1b) 0,4 ccm Serum akt. + 0,001 ccm Immunserum	664
2a) Lyten + 0,2 ccm Serum akt. + 0,05 ccm Aggressin 56°	
2b) 0,4 ccm Serum akt. + 0,001 ccm Immunserum	940
3a) Lyten + 0,2 ccm Serum akt. + 0,0005 ccm Immunserum	
3b) 0,4 ccm Serum akt. + 0,1 ccm Exsudatflüssigkeit 56°	560
4a) Lyten + 0,2 ccm Serum akt. + 0,0005 ccm Immunserum	
4b) 0,4 ccm Serum akt. + 0,1 ccm Aggressin 56°	47 000
5a) Lyten + 0,25 ccm Serum akt.	
5b) 0,3 ccm Serum akt. + 0,1 ccm Exsudatfl. 56° + 0,001 ccm Immunserum	820
6a) Lyten + 0,25 Serum akt.	
6b) 0,3 ccm Serum akt. + 0,1 ccm Aggressin 56° + 0,001 ccm Immunserum	66 000
7a) Lyten + 0,15 ccm Serum akt. + 0,05 ccm Aggressin + 0,0005 ccm Immunserum	
7b) 0,5 ccm Serum akt.	ca. 70 000

Tabelle VIII.

Aggressin und Kokken eines schwer infizierten Meerschweinchens. Anordnung der bisherigen analog.

	In 0,25 ccm von b	4 Std. nach Mischung
1a) Lyten + 0,2 ccm Ser. akt. + 0,0005 ccm I.-Ser.		
1b) 0,3 ccm Serum akt. + 0,2 ccm Exsudatfl. 56°	19 000	2 864
2a) Lyten + 0,2 ccm Ser. akt. + 0,005 ccm I.-Ser.		
2b) 0,3 ccm Serum akt. + 0,2 ccm Exsudatfl. 56°	14 200	980
3a) Lyten + 0,2 ccm Ser. akt. + 0,0005 ccm I.-Ser.		
3b) 0,3 ccm Serum akt. + 0,2 ccm Aggressin 56°	13 400	über 50 000
4a) Lyten + 0,2 ccm Ser. akt. + 0,005 ccm I.-Ser.		
4b) 0,3 ccm Serum akt. + 0,2 ccm Aggressin 56°	18 000	6 100
5a) Lyten + 0,1 ccm Exsudatfl. 56° + 0,00025 ccm Immunserum		
5b) 0,4 ccm Serum akt. + 0,0005 ccm Immunser.	7 900	492
6a) Lyten + 0,1 ccm Exsudatfl. 56° + 0,005 ccm Immunserum		
6b) 0,4 ccm Serum akt. + 0,005 ccm Immunser.	17 000	720
7a) Lyten + 0,1 ccm Aggressin 56° + 0,00025 ccm Immunserum		
7b) 0,4 ccm Serum akt. + 0,0005 ccm Immunser.	10 000	11 300
8a) Lyten + 0,1 ccm Aggressin 56° + 0,0025 ccm Immunserum		
8b) 0,4 ccm Serum akt. + 0,005 ccm Immunser.	15 800	580

	In 0,25 ccm von b	4 Std. nach Mischung
9a) Lyten + 0,2 ccm Ser. akt. + 0,00025 ccm I.-Ser.		
9b) 0,2 ccm Serum akt. + 0,2 ccm Exsudatfl. + 0,0005 ccm Immunserum	12 300	1 768
10a) Lyten + 0,2 ccm Ser. akt. + 0,00025 ccm I.-Ser.		
10b) 0,2 ccm Serum akt. + 0,2 ccm Exsudatfl. + 0,005 ccm Immunserum	12 000	840
11a) Lyten + 0,2 ccm Ser. akt. + 0,00025 ccm I.-Ser.		
11b) 0,2 ccm Serum akt. + 0,2 ccm Aggressin + 0,0005 ccm Immunserum	26 600	ca. 80 000
12a) Lyten + 0,2 ccm Ser. akt. + 0,0025 ccm I.-Ser.		
12b) 0,2 ccm Serum akt. + 0,005 ccm Immun- serum + 0,2 ccm Aggressin	19 000	2 640

Besonders der letzte, einigermaßen quantitativ angestellte Versuch ist in hohem Grade lehrreich. Man sieht deutlich, wie 0,1 ccm Aggressin, wenn es zu einer Mischung von Zellen und 0,0005 Immunserum zugesetzt wird, die sonst sehr merkbare Zellbakterizidie, die ohne Aggressin möglich ist, verhindert (No. 3 im Vergleich zu No. 1); verwendet man aber bei sonst ganz gleichen Verhältnissen 0,005 ccm Immunserum, so ist trotz des Aggressins eine unverkennbare Entwicklungshemmung sichtbar (No. 4 im Vergleich zu 2); es ist also gerade die Grenze erreicht, wo Aggressin und Immunserumwirkung einander gegenseitig paralisieren. Mischt man Leukocyten mit Aggressin, während die Kokken der Wirkung von Immunserum ausgesetzt sind, so vermag 0,005 ccm Immunserum noch starke Zellwirkung zu veranlassen, nicht mehr aber 0,0005 ccm; da in den entsprechenden Proben (5 und 6) ohne Aggressin gleichmäßig starke Abtötung stattfindet, also die Kokken in diesen Mischungen (5b und 6b) gut sensibilisiert waren, so ist dies ein Beweis dafür, daß auch sensibilisierte Kokken nicht unter allen Umständen von Zellen abgetötet werden. Ist die Sensibilisierung stärker (bei 8b), dann schädigt allerdings das Aggressin die Zellen nicht mehr. Kokken in einer Mischung von normaler Exsudatflüssigkeit, Normalserum und Immunserum erweisen sich sowohl bei 0,005 wie bei 0,00005 ccm des letzteren als sensibilisiert, wendet man aber die pathologische aggressive Exsudatflüssigkeit an, so haben in dieser die Kokken nur bei der größeren Immunserumdosis einen Teil des wirksamen Serums an sich gezogen, in der kleineren Immundosis überhaupt nichts. Damit ist der Antagonismus zwischen Serum und Aggressin als ein direkter

nachgewiesen; die Kokken vermögen sich im Aggressin nicht zu sensibilisieren, die wesentlich bakteriotropen Stoffe des Immunserums nicht aufzunehmen. Es ist unter solchen Umständen klar, daß bei gleichzeitigem Zusatze von Kokken, Serum und Aggressin von einer Leukocytenwirkung keine Rede mehr sein kann; erst wenn die Immunserumdosis sehr bedeutend erhöht wird, erfolgt auch unter diesen Umständen erst Zellwirkung.

Wählt man nun eine Versuchsanordnung, wie die in den Tabellen III—V, wo man, um eine halbwegs sichere Sensibilisierung zu erzielen, verhältnismäßig große Immunserumdosen anwenden und längere Zeit einwirken lassen muß, so kann leicht der fehlerhafte Schluß entstehen, daß Immunserum und Aggressin sich direkt überhaupt nicht beeinflussen. Denn die Dosen Immunserum, welche bei der überhaupt nicht ganz leichten Sensibilisierung des Streptococcus in dieser Anordnung noch zum Ziele führen (nach den Tabellen genügen 0,01 ccm noch nicht) sind bereits ein Multiplum der bei anderer Anordnung genügenden.

Die Hauptwirkung des Streptokokkenaggressins liegt somit in einer direkten Verhinderung der Sensibilisierung, womit auch die Verhinderung der Phagocytose und der Bakterizidie lebender Leukocyten verbunden ist. Ob diese Wirkung die einzige ist, oder ob daneben noch eine direkte Lähmung der Leukocyten in Frage kommt, ist nach den bisherigen Versuchen noch nicht mit Sicherheit zu sagen. Ganz entscheiden würde sich diese Frage nur an Streptokokken lassen, welche schon an sich, ohne Immunserum, der Zellwirkung zugänglich sind.

Die in den Tabellen VI—VIII gewählte Versuchsanordnung ist nun auch geeignet, die Verhältnisse, wie sie im Tierkörper bei vorzeitiger, gleichzeitiger oder nachträglicher Seruminjektion für den Infektionsverlauf vorliegen, nachzuahmen. Dieser ist für Meerschweinchen bekannt. Die intra-peritoneal injizierten Kokken erfahren im normalen Tiere in der allerersten Zeit einen Wachstumsstillstand; meist noch während desselben beginnt der Leukocytenzufluß, der aber ohne sichtbaren Effekt auf die inzwischen einsetzende Kokkenvermehrung ist. Phagocytose findet bei infektiösen Strepto-



kokken, wie dies schon den älteren Forschern der belgischen und französischen Schule genau bekannt war, entweder gar nicht oder nur in sehr geringem Umfange statt, von sonstiger Keimvernichtung ist ebenfalls nichts zu sehen. Trotz der immer intensiver zunehmenden Vermehrung wird aber der Leukocytenzufluß in die kokkenerfüllte Bauchhöhle höchstens etwas verringert, nie ganz gehemmt, wie dies bereits Weil richtig hervorgehoben hat; dadurch unterscheidet sich die Streptokokkeninfektion sehr scharf von intraperitonealen Infektionen mit Halbparasiten, wie Typhus oder Cholera, wo eine schwere Infektion sich in einer nahezu leukocytenfreien Bauchhöhle abspielt.

Injiziert man mit der Kokkendosis gleichzeitig Immunsérum, so unterscheidet sich zunächst der Verlauf nicht von dem Versuch ohne Immunsérum und es läßt sich nicht mit Sicherheit der Eindruck gewinnen, daß eine extracelluläre Vernichtung der Kokken stattfindet; wenn eine solche überhaupt besteht (Reich), so ist sie jedenfalls für den benutzten Coccus und das Aronsonsche Sérum nur eine ganz geringfügige. Mit dem Eintreten von Leukocyten aber sistiert die Vermehrung oder, wenn sie noch nicht erfolgt war, setzt sie überhaupt nicht ein, während in kürzerer oder längerer Zeit die freien Kokken vor der zunehmenden Phagocytose verschwinden. Macht man die Immunséruminjektion erst dann, wenn in der Bauchhöhle bereits Kokkenvermehrung neben Leukocytose eingetreten ist, so bemerkt man ebenfalls rasch einsetzende Phagocytose und Kokkenvernichtung. Diese Verhältnisse lassen sich nun im Reagenzglasversuch in ganz deutlicher Weise erkenntlich machen.

#### Tabelle IX.

Als Aggressin dient das zentrifugierte und  $\frac{1}{2}$  Stunde auf  $56^{\circ}$  erhitzte Peritonealexsudat eines schwer infizierten Meerschweinchens, dessen Kokken auch zur Einsaat verwendet werden. Die Versuchsflüssigkeiten werden in 2 Reihen hergestellt, von denen die eine 0,25, die andere, in welche die Kokkeneinsaat erfolgt, 0,5 ccm Gesamtvolumen hat. Nach 1-stündigem Stehen bei  $37^{\circ}$  wird je 0,25 ccm der Reihe b mit der Flüssigkeit der Reihe a vermischt, während der Rest zur Platte verarbeitet wird und die absolute Menge der verwendeten Kokken anzeigt.

Zeitschr. f. Immunitätsforschung. Orig. Bd. XIII.

20

## A. Proben ohne Leukocyten.

1a) 0,25 ccm Ser. akt. mit 0,0001 ccm Immunser.		
1b) 0,3 ccm Serum akt. + 0,2 ccm Exsudatfl. 56° + Kokken	7900	8 200 Z
2a) 0,25 ccm Ser. akt. mit 0,001 ccm Immunser.		
2b) Wie 1b	2320	9 100 Z
3a) 0,25 ccm Ser. akt. mit 0,01 ccm Immunser.		
3b) Wie 1b	1952	5 600 Z
4a) 0,25 ccm Ser. akt. mit 0,0001 ccm Immunser.		
4b) 0,3 ccm Ser. akt. + 0,2 ccm Aggressin in 56° + Kokken	6840	} ca. 100 000
5a) 0,25 ccm Ser. akt. mit 0,001 ccm Immunser.		
5b) Wie 4b	8800	
6a) 0,25 ccm Ser. akt. mit 0,01 ccm Immunser.		
6b) Wie 4b	5968	

## B. Zutritt von Leukocyten ohne Immunserum.

1a) 0,25 ccm Ser. akt. + Lyten		
1b) 0,3 ccm Ser. akt. + 0,2 ccm Exsudatfl. 56° + Kokken	1022	über 30 000
2a) 0,25 ccm Ser. akt. + Lyten		
2b) 0,3 ccm Ser. akt. + 0,2 ccm Aggressin in 56° + Kokken	3620	über 30 000

## C. Zutritt von Leukocyten und Immunserum.

1a) 0,25 ccm Ser. akt. mit 0,0001 ccm Immunserum + Lyten		
1b) 0,3 ccm Ser. akt. + 0,2 ccm Exsudatfl. + Kokken	4248	6 600
2a) 0,25 ccm Ser. akt. mit 0,001 ccm Immunserum + Lyten	2256	580
2b) Wie 1b		
3a) 0,25 ccm Ser. akt. mit 0,0001 ccm Immunserum + Lyten		
3b) 0,3 ccm Ser. akt. + 0,2 ccm Aggressin + Lyten	2280	33 000
4a) 0,25 ccm Ser. akt. mit 0,001 ccm Immunserum		
4b) Wie 3b	1432	37 600
5a) 0,25 ccm Ser. akt. mit 0,01 ccm Immunserum + Lyten		
5b) Wie 3b	1280	4 720

## D. Immunserum zu Leukocyten und Kokken.

1a) Lyten + 0,15 ccm Ser. akt. 0,1 ccm Exsudatfl. + Kokken		
1b) 0,4 ccm Ser. akt. + 0,0001 ccm Immunserum	4264	14 000
2a) Lyten + 0,15 ccm Ser. akt. + 0,1 ccm Exsudatfl. + Kokken		
2b) 0,4 ccm Ser. akt. + 0,001 ccm Immunserum	—	984
3a) Lyten + 0,15 ccm Ser. akt. + 0,1 ccm Aggressin + Kokken.		
3b) 0,4 ccm Ser. akt. + 0,0001 ccm Immunserum	4560	über 40 000
4a) Lyten + 0,15 ccm Ser. akt. + 0,1 ccm Aggressin + Kokken		
4b) 0,4 ccm Ser. akt. + 0,001 ccm Immunserum	—	über 40 000
5a) Lyten + 0,15 ccm Ser. akt. + 0,1 ccm Aggressin + Kokken		
5b) 0,4 ccm Ser. akt. + 0,01 ccm Immunserum	—	10 900

Die Reihe A dieser Tabelle sucht die Verhältnisse nachzuahmen, wie sie in einem passiv immunisierten Tiere eintreten müßten, in dessen Bauchhöhle kein Leukocytenzutritt stattfindet, wobei in den Proben 4—6 die Infektion durch bereits gebildetes Aggressin zu einer schwereren gemacht wird. Man merkt, abgesehen von der durch Zusammenballung der Kokken vorgetäuschten Entwicklungshemmung in den ersten 3 Röhrchen, keine antibakterielle Wirkung.

Die Reihe B gibt die Verhältnisse wieder, wie sie im normalen Tiere bestehen, wenn in die Bauchhöhle, in der sich Kokken mit oder ohne Aggressinbildung vermehrt haben, Leukocyten in größerer Zahl eintreten; man merkt nicht das geringste von einer Keimvernichtung.

In der Reihe C haben sich die Kokken in der noch zellfreien Bauchhöhle mit und ohne Aggressinbildung vermehrt, wenn Leukocyten zuströmen und gleichzeitig damit eine Injektion von Immunserum gemacht wird. Schon die kleinste Immunserumdosis bringt unter solchen Umständen deutliche Entwicklungshemmung, die nächst höhere starke Abtötung hervor, vorausgesetzt, daß noch kein Aggressin gebildet ist. Ist dieses vorhanden (3—5), so bringt erst die 100-fache Immunserummenge ungefähr jene Entwicklungshemmung hervor, welche ohne Aggressin mit 0,0001 ccm Immunserum erreicht wurde.

Die Reihe D bringt einen Heilversuch, bei dem sich Kokken in der von Leukocyten bereits erfüllten Bauchhöhle mit oder ohne Aggressinbildung vermehrt haben, worauf erst die Immunseruminjektion folgt. Man bemerkt, ähnlich wie in der Reihe C, daß die Steigerung des Immunserums eine 100-fache sein muß, um bei Anwesenheit von Aggressin ungefähr die gleiche Entwicklungshemmung, wie ohne Aggressin hervorzubringen.

Tabelle X.

Als Aggressin dient das zentrifugierte und durch  $\frac{1}{2}$ -ständiges Erwärmen sterilisierte Exsudat eines schwer infizierten Meerschweinchens, dessen Kokken gleichzeitig zur Einsaat benutzt wurden. Die Immunserumverdünnungen sind mit aktivem Meerschweinchenserum hergestellt. Die Anordnung ist der des vorigen Versuchs analog.

20\*

A. Zutritt von Leukocyten in die Bauchhöhle eines passiv immunen infizierten Tieres.

1a) Lyten + 0,25 ccm Ser. akt.		
1b) 0,15 ccm Serum akt. + 0,25 Exsudatfl. 56° + 0,0001 ccm Immunserum + Kokken	528	24 000
2a) Wie 1a		
2b) 0,15 ccm Serum akt. + 0,25 Exsudatfl. 56° + 0,001 ccm Immunserum + Kokken	384	472
3a) Wie 1a		
3b) 0,15 ccm Serum akt. + 0,25 Aggressin 56° + 0,0001 ccm Immunserum + Kokken	596	40 000
4a) Wie 1a		
4b) 0,15 ccm Serum akt. + 0,25 Aggressin 56° + 0,001 ccm Immunserum + Kokken	672	19 000
5a) Wie 1a		
5b) 0,15 ccm Serum akt. + 0,25 Aggressin 56° + 0,01 ccm Immunserum + Kokken	412	866

B. Kokkenvermehrung bei Anwesenheit von Leukocyten, Seruminjektion.

1a) Lyten + 0,25 ccm Exsudatflüssigkeit 56° + Kokken		
1b) 0,3 ccm Serum akt. + 0,0002 ccm Immunserum	688	23 000
2a) Wie 1a		
2b) 0,3 ccm Serum akt. + 0,002 ccm Immunserum	—	208
3a) Wie 1a		
3b) 0,3 ccm Serum akt. + 0,02 ccm Immunserum	—	125
4a) Lyten + 0,25 ccm Aggressin 56° + Kokken		
4b) 0,3 ccm Serum akt. + 0,0002 ccm Immunserum	840	39 000
5a) Wie 4a		
5b) 0,3 ccm Serum akt. + 0,002 ccm Immunserum	—	40 000
6a) Wie 4a		
6b) 0,3 ccm Serum akt. + 0,02 ccm Immunserum		2 684

Der Abschnitt A dieses Experimentes sucht die Verhältnisse in der Bauchhöhle eines passiv immunisierten Tieres nachzuahmen: es ist bereits eine geringe Vermehrung (die Menge der jedem Röhrchen b anfangs zugesetzten Kokken betrug 86) der Kokken eingetreten, wenn die Leukocyten zugesetzt werden. Man bemerkt die sofortige Keimvernichtung bei 0,001 ccm Immunserum, die aber bei Gegenwart von Aggressin erst bei einer 10-fachen Erhöhung der Immunserummenge in ungefähr ähnlicher Weise zu erreichen ist.

Der Abschnitt B stellt die Nachahmung eines Heilver Versuches dar; trotz Anwesenheit von Leukocyten ist bereits Vermehrung eingetreten, wenn das Immunserum injiziert wird. Schon 0,001 ccm Immunserum erreichen dann Abtötung, die aber bei Gegenwart von Aggressin selbst durch die 10-fache Immunserummenge nicht in gleicher Weise erzielt werden kann.

So bestätigen auch diese Versuche die oben ausgesprochene Notwendigkeit, bei Heilver suchen nicht nur die Zahl der im

Organismus bereits herangewachsenen Kokken in Betracht zu ziehen, sondern auch deren bereits gebildete Stoffwechselprodukte aggressiven Charakters zu berücksichtigen. Diese müssen durch das Serum erst neutralisiert werden, ehe eine Einwirkung auf die Kokken selbst zu erwarten ist.

Es liegt auf der Hand, daß dadurch die Aussichten, zu einer Heilung der bereits ausgesprochenen Streptokokkeninfektion zu gelangen, sehr erheblich vermindert werden; immerhin könnte diesem Umstande durch die Erzeugung sehr hochwertiger Seren und ihre Anwendung in großer Menge einigermaßen abgeholfen werden. Eine andere Frage aber, die nach der physiologischen Einheit oder Vielheit der infektiösen Streptokokkenstämme und damit nach der Poly- oder Monovalenz des Immunserums, erscheint noch wichtiger und die mitzuteilenden Reagenzglasversuche stimmen mit der Mehrzahl der bisher gemachten Erfahrungen darin überein, daß ein für einen Stamm sehr hochwertiges Serum einen zweiten gar nicht zu beeinflussen braucht. Die Versuche wurden im Reagenzglase in der Weise angestellt, daß das Aggressin zweier verschiedener Streptokokkenstämme in seiner Wirkung auf Leukocyten mit und ohne das Aronsonsche Immunserum geprüft wurde. Zunächst wurde ein Streptokokkenstamm „Bei“, den wir der Freundlichkeit der Höchster Farbwerke verdanken, mit dem Stamme Aronson verglichen. Gleichzeitig von Herrn Doz. Weil angestellte Tierversuche hatten ergeben, daß das Serum Mäuse gegen die Infektion mit diesem Stamme nicht zu schützen vermag.

#### Tabelle XI.

Ein kleines Meerschweinchen erhielt 2,5 ccm Serumbouillonkultur von Streptokokkenstamm „Bei“ und starb nach ca. 16 Stunden. In der Bauchhöhle fanden sich ca. 3 ccm Exsudates von eigentümlicher Beschaffenheit. Die Flüssigkeit war an sich relativ wenig trüb, enthielt aber zahlreiche Flöckchen, die ganz aus großen Mengen dichtgedrängter Kokken bestanden. Dieselben hatten schmale Kapselsäume. Leukocyten waren nur in sehr geringer Menge vorhanden, das Herzblut des Tieres war mikroskopisch steril.

Ein anderes Meerschweinchen war intraperitoneal mit der gleichen Menge von Streptokokkenstamm Aronson infiziert worden, starb nach 8 Stunden und lieferte ca. 5 ccm Exsudat von bekannter Beschaffenheit.

Beide Exsudate wurden gründlich zentrifugiert und durch  $\frac{1}{2}$ -stündige Erwärmung auf  $58^{\circ}$  sterilisiert. Zur Einsaat wurden die Kokken der beiden Exsudate verwendet.

A. Einsaat 11 000 Strept. Bei.

1)	0,4 cem Ser. akt. + 0,1 cem Exsudatfl. $56^{\circ}$	45 000
2)	dgl.           +   "           "           + Lyten	31 000
3)	"           +   "           Aggressin Bei $56^{\circ}$	} ca. 40 000
4)	"           +   "           "           "           + Lyten	
5)	"           +   "           "           Aronson $56^{\circ}$	
6)	"           +   "           "           "           + Lyten	
7)	} Wie No. 1—6, mit je 0,001 cem Immunserum Aronson	50 000
8)		39 000
9)		31 000
10)		40 000
11)		22 000
12)		40 000

B. Einsaat 1032 Strept. Aronson.

1)	0,4 cem Ser. akt. + 0,1 cem Exsudatfl. $56^{\circ}$ + 0,001 cem Immunserum	4 240Z
2)	0,4 cem Ser. akt. + 0,1 cem Exsudatfl. $56^{\circ}$ + 0,001 cem Immunserum + Lyten	139
3)	0,4 cem Ser. akt. + 0,1 cem Aggressin Bei $56^{\circ}$ + 0,001 cem Immunserum	5 820Z
4)	0,4 cem Ser. akt. + 0,1 cem Aggressin Bei $56^{\circ}$ + 0,001 cem Immunserum + Lyten	79
5)	0,4 cem Ser. akt. + 0,1 cem Aggressin Aronson $56^{\circ}$ + 0,001 cem Immunserum	5 760Z
6)	0,4 cem Ser. akt. + 0,1 cem Aggressin Aronson $56^{\circ}$ + 0,001 cem Immunserum + Lyten.	27 300

Der Versuch läßt deutlich erkennen, daß der infektiöse Streptococcus „Bei“ sich der Wirkung der Leukocyten gegenüber genau so wie der Aronsonsche verhält. Zusatz von Immunserum Aronson, welches die Zellen gegen diesen Stamm selbst sofort bakterizid macht, ist gegen Streptococcus „Bei“ so gut wie ganz unwirksam. Das von einem damit infizierten Tiere gewonnene Aggressin vermag die Wirkung des Immunserums gegen den Stamm Aronson in keiner Weise zu beeinträchtigen, was ein Aronson-Aggressin in vollkommenster Weise tut. Ganz entsprechend der Tatsache, daß das Aronsonsche Serum im Tierversuche gegen den Stamm „Bei“ keine Schutzkraft entfaltet, verhalten sich die beiden Stämme auch in allen Modifikationen des Reagenzglasversuches wie zwei völlig verschiedene, voneinander ganz unabhängige Mikroorganismen.

Es lassen sich jedoch Streptokokkenstämme auffinden, gegen welche das Aronsonsche Serum, welches als poly-

Ein mit einer Serumbouillonkultur des Streptococcus Höchst intra-peritoneal infiziertes Meerschweinchen starb nach ca. 16 Stunden und lieferte ca. 3 ccm dicht trüben, gelblichen Exsudates mit relativ wenigen Leukocyten und sehr spärlicher Phagocytose und enormen Mengen von Kokken, die fast nur als Einzelkokken oder Diploformen ohne Kapsel oder nur mit ganz schmalem Saume erschienen. Im Herzblute waren Kokken schon mikroskopisch zu finden. Der Sektionsbefund wies mit dem des Aronsonschen Coccus die größte Ähnlichkeit auf. Im Versuche wurde das Exsudat eines mit dem Aronson'schen Streptococcus infizierten Tieres verwendet.

A. Einsaat Strept. Höchst aus Serumbouillonkultur = 9800. nach 4 Std.

B. Einsaat Strept. Aronson aus Serumbouillonkultur = 1448.

1) 0,4 ccm Ser. aktiv + 0,1 ccm Exsudatfl. 56° + 0,001 ccm Immunserum	4 600
2) 0,4 ccm Ser. aktiv + 0,1 ccm Exsudatfl. 56° + 0,001 ccm Immunserum + Lyten	592
3) 0,4 ccm Ser. akt. + 0,1 ccm Aggressin Höchst 56° + 0,001 ccm Immunserum	14 000
4) 0,4 ccm Ser. akt. + 0,1 ccm Aggress. Höchst 56° + 0,001 ccm Immunserum + Lyten	20 000
5) 0,4 ccm Ser. akt. + 0,1 ccm Aggressin Aronson 56° + 0,001 ccm Immunserum	5 900
6) 0,4 ccm Ser. akt. + 0,1 ccm Aggress. Aronson 56° + 0,001 ccm Immunserum + Lyten	15 000

Man erkennt sofort, daß das Immunserum den Höchster Stamm sehr stark mit Leukocyten zusammen beeinflußt, und ebenso, daß sich die von beiden Stämmen gewonnenen Aggressine vertreten können.

Von Interesse sind Versuche mit einem unmittelbar aus dem Blute einer schwersten Puerperalsepsis gezüchteten Stamme „Ma“. Das Blut der Patientin wies einige Stunden vor dem Tode ca. 1500 Kokken in 1 ccm auf. Die Infektiosität des Coccus für Meerschweinchen war von Anfang an sehr gering.

## Tabelle XIII.

Meerschweinchen 1, 200 g, erhielt eine üppig gewachsene Serumbouillonkultur (2. Generation aus dem Menschen) intraperitoneal. 4 Stunden später lieferte eine Kapillarentnahme wenige freie Kokken, zahlreiche Leukocyten mit sehr starker Phagocytose normal aussehender Kokken. Das Tier starb in der Nacht. In der Bauchhöhle fanden sich etwa 5 ccm eines wenig trüben Exsudates, dessen Leukocyten zwar nur zum Teil, dann aber sehr starke Phagocytose aufweisen. Am Netze war die Phagocytose sehr stark ausgesprochen, freie Kokken fehlten hier ebenso wie in den Organen und im Herzblute, das sich auch in der Kultur als steril erwies, während das Peritonealexsudat reichliches Wachstum lieferte.

Meerschweinchen 2 erhielt eine Serumbouillonkultur aus Meerschweinchen 1 intraperitoneal und starb in der gleichen Nacht. Das Peritonealexsudat zeigte bei mäßigem Leukocytengehalte und geringer Phagocytose zerstreute freie Kokken, ohne Kettenbildung, öfters in Häufchen gelagert, die so aussehen, als ob sie aus Phagocyten ausgefallen wären. Netzpräparate enthielten freie Kokken in großer Zahl; die vorhandenen Zellen waren schlecht erhalten, ohne merkbare Phagocytose. Das Herzblut war steril. Das Exsudat des Tieres wurde zentrifugiert und sterilisiert, ebenso das Exsudat eines mit Streptococcus Aronson geimpften und tyisch gestorbenen Tieres.

Zur Verwendung kommen die erwähnten Exsudate als Aggressine. Die Einsaat erfolgt mit Streptokokken aus Bouillonkulturen der I. Passage.

A. Einsaat Strept. Ma = 7400			nach 4 Std.
1)	0,4 ccm Ser. akt. + 0,1 ccm Exsudatfl. 56°		60 000
2)	dgl.           +   "           "           + Lyten		3 880
3)	"           +   "           Aggressin Aronson 56°		80 000
4)	"           +   "           "           + Lyten		1 288
5)	0,4 ccm Ser. akt. + 0,1 ccm Exsudatfl. 56° + 0,001 ccm Immunserum		60 000
6)	0,4 ccm Ser. akt. + 0,1 ccm Exsudatfl. 56° + 0,001 ccm Immunserum + Lyten		3 440
7)	0,4 ccm Ser. akt. + 0,1 ccm Aggressin Aronson 56° + 0,001 ccm Immunserum		60 000
8)	0,4 ccm Ser. akt. + 0,1 ccm Aggressin Aronson 56° + 0,001 ccm Immunserum + Lyten		1 128



B. Einsaat Strept. Aronson = 9200.			nach 4 Std.
1)	0,4 ccm Ser. akt. + 0,1 ccm Exsudatfl. 56°		12 000
2)	dgl.           +       "           "           + Lyten		50 000
3)	0,4 ccm Ser. akt. + 0,1 ccm Exsudatfl. 56° + 0,001 ccm Immunserum		12 000 Z
4)	0,4 ccm Ser. akt. + 0,1 ccm Exsudatfl. 56° + 0,001 ccm Immunserum + Lyten		632
5)	0,4 ccm Ser. akt. + 0,1 ccm Aggressin Aronson 56° + 0,001 ccm Immunserum		16 000
6)	0,4 ccm Ser. akt. + 0,1 ccm Aggress. Aronson 56° + 0,001 ccm Immunserum + Lyten		14 200

Man bemerkt, daß das für den eigenen Stamm sehr wirksame Aggressin Aronson die Leukocytenwirkung gegen den Stamm „Ma“ gar nicht beeinträchtigt hat. Das Immunserum hat auf die Leukocytenbakterizidie selbst bei Streptococcus „Ma“ keinerlei Einfluß.

Die Empfindlichkeit des für Meerschweinchen nicht infektionstüchtigen Streptococcus gegen die Leukocytenwirkung stimmt mit der alten Erfahrung überein, daß solche Kokken auch der Phagocytose ohne Zusatz von Immunserum unterliegen.

Tabelle XIV.

Ein mit einer Serumbouillonkultur der III. Passage von Strept. „Ma.“ geimpftes kleines Meerschweinchen wurde nach 10 Stunden in Agone getötet und enthielt ca. 7 ccm trübes, mäßig leukocytenreiches Exsudat, Kokken waren zahlreich, wenn auch noch immer ohne Vergleich zu den Kokkenmassen, die sich nach einer Impfung mit dem Aronsonschen Streptococcus entwickeln. Phagocytose war nicht selten, Netzpräparate zeigten große Mengen freier Kokken. Das Herzblut war steril. Das Exsudat wurde gleichzeitig mit dem eines anderen mit Strept. Aronson infizierten Meerschweinchens zentrifugiert und bei 56° sterilisiert. Die aus denselben gewonnenen Kokken dienten zur Einsaat.

A. Einsaat Strept. Ma = 1424.			
1)	0,4 ccm Ser. akt. + 0,1 ccm Exsudatfl. 56°		28 000
2)	dgl.           +       "           "           + Lyten		12
3)	"           +       "           Aggressin Ma 56°		31 000
4)	"           +       "           "           "           + Lyten		57
5)	"           +       "           Aggressin Aronson 56°	ca. 40 000	
6)	"           +       "           "           "           + Lyten	9	
7)	0,4 ccm Ser. akt. + 0,1 ccm Exsudatfl. 56° + 0,001 ccm Immunserum		19 000
8)	0,4 ccm Ser. akt. + 0,1 ccm Exsudatfl. 56° + 0,001 ccm Immunserum + Lyten		10
9)	0,4 ccm Ser. akt. + 0,1 ccm Aggressin Ma 56° + 0,001 ccm Immunserum		20 000
10)	0,4 ccm Ser. akt. + 0,1 ccm Aggressin Ma 56° + 0,001 ccm Immunserum + Lyten		204
11)	0,4 ccm Ser. akt. + 0,1 ccm Aggress. Aronson 56° + 0,001 ccm Immunserum		30 000
12)	0,4 ccm Ser. akt. + 0,1 ccm Aggress. Aronson 56° + 0,001 ccm Immunserum + Lyten		42

## B. Einsaat Strept. Aronson = 820.

1) 0,4 ccm Ser. akt. + 0,1 ccm Exsudatfl. 56° + 0,001 ccm Immunserum	5 800 Z
2) 0,4 ccm Ser. akt. + 0,1 ccm Exsudatfl. 56° + 0,001 ccm Immunserum + Lyten	41
3) 0,4 ccm Ser. akt. + 0,1 ccm Aggressin Ma 56° + 0,001 ccm Immunserum	6 200
4) 0,4 ccm Ser. akt. + 0,1 ccm Aggressin Ma 56° + 0,001 ccm Immunserum + Lyten	44
5) 0,4 ccm Ser. akt. + 0,1 ccm Aggress. Aronson 56° + 0,001 ccm Immunserum	16 000
6) 0,4 ccm Ser. akt. + 0,1 ccm Aggress. Aronson 56° + 0,001 ccm Immunserum + Lyten	16 000

Wie im vorigen Versuche, so war auch das Aronson-sche Aggressin ganz ohne Einfluß auf die Abtötung des Strept. „Ma“ durch die normalen Leukocyten des Meerschweinchens. Dieser Streptococcus selbst lieferte bei seinem allerdings sehr beschränkten Wachstum im Tiere keine Flüssigkeiten von aggressivem Charakter, weder für einen anderen Stamm, noch für sich selbst. Das kann freilich mit der relativ geringen Vermehrung in der Meerschweinchenbauchhöhle erklärt werden.

## Zusammenfassung.

Die während einer Streptokokkeninfektion im Tierkörper gebildeten Exsudate tragen aggressiven Charakter und zeichnen sich durch ihr antagonistisches Vermögen gegen ein hochwertiges Immunserum aus. Dabei ist die Beeinflussung des Immunserums durch das Aggressin eine direkte.

Die von einem infektiösen Stamme gebildeten Aggressive können auch die Wirkung des Immunserums gegen einen anderen Stamm aufheben, wenn dieses auch im Tierversuche gegen ihn wirksam ist. Trifft dies nicht zu, so haben auch die Aggressive beider Stämme keine Beziehung zueinander.

Ein für Meerschweinchen nicht oder nur wenig infektiöser Stamm unterschied sich von den infektiösen dadurch, daß er schon durch normale Leukocyten allein in hohem Grade abgetötet wurde; er lieferte kein Aggressin im Tierkörper.

*Nachdruck verboten.*

[Aus der bakteriolog. Abteilung der chem. Fabrik auf Aktien  
(vorm. E. Schering), Berlin.]

**Zur Toxinbildung des Milzbrandbacillus.**

Von Dr. A. Marxer.

(Eingegangen bei der Redaktion am 26. Februar 1912.)

Der Milzbrand gehört zu den Krankheiten, dessen Symptome vielfach Anzeichen für eine Giftbildung seines Erregers geben. So ist denn auch frühzeitig von zahlreichen Forschern versucht worden, das Toxin des Milzbrandbacillus zu finden. Man suchte zunächst die Gifte im Tierkörper, dann in den Nährsubstraten und im Bacillenleib selbst.

Schon der Begründer der zielbewußten aktiven Immunisierung, Pasteur (1), filtrierte Blut von Milzbrandtieren und Milzbrandkulturen durch Tonkerzen und injizierte diese Tieren, ohne je Giftwirkung zu bemerken. Ebenso fruchtlos waren die Versuche von Tatarski (2). In der gleichen Richtung bewegen sich die Untersuchungen von Martin (3). Es gelang ihm, aus dem Blut, ödematösem Gewebe und Organen eine Albumose und ein Alkaloid zu gewinnen, die in großen Dosen bei subkutaner Injektion ein lokales Oedem, Temperatursteigerung und zuweilen Milzschwellung hervorriefen. Der alkaloidartige Körper, der ein Abkömmling der Albumose sein soll, war ca. 3mal so giftig und tötete Mäuse in Mengen von 0,1—0,15 g. In geringerer Menge fand er dieselben Körper auch in Kulturfiltraten. Balp und Carbone (4) isolierten aus dem ödematösen Gewebe und der Leber eines Gerbers einen Eiweißkörper, der ebenso giftig war, wie das Alkaloid Martins. Landi (5) fand ebenfalls im Blute und in den Organen von Milzbrandtieren einen Eiweißkörper, den er Mäusen, Meerschweinchen und Kaninchen injizierte. Die Hälfte der behandelten Tiere ging erst nach längerer Zeit zugrunde, die anderen Tiere blieben am Leben.

Brieger und Fränkel (6) gewannen Toxalbumine aus Milzbrandorganen. Conradi (7) nahm diese Versuche wieder auf größerer Basis auf, konnte aber weder mit filtriertem Exsudat noch mit Organfiltrat von an Milzbrand gefallen Tieren eine Giftwirkung beobachten. In neuerer Zeit haben dann Levy und Beckmann (8) versucht, im Serum das Gift nachzuweisen, indem sie Tieren das gesamte Serum von anderen schwerkranken Tieren injizierten. Die Bacillen hatten sie durch Zentrifugieren entfernt. Das Serum der kranken Tiere hatte aber keine andere Wirkung

als normales Serum derselben Tierart. Auch konnten sie damit keine Immunität erzielen.

Nach unseren jetzigen Kenntnissen von den Toxinen ist es auch leicht verständlich, warum in den Organen, dem Blut und den Gewebssäften kein Gift gefunden wurde. Es hätte schon in sehr großer Menge oder in sehr großer Stärke vorhanden sein müssen, um auf dem Wege der Giftwirkung auf Versuchstiere gefunden zu werden.

Geringe Erfolge mußten auch die Versuche mittels Kollodium- und Schilfsäckchen [Sanarelli (9), Conradi] versprechen, da diese Methoden ja nur imstande waren, ein diffusibles Gift aufzufinden.

Mehr Aussicht auf ein Gelingen hatten zweifellos die Untersuchungen, aus den Kulturen und den Bacillen selbst das Toxin zu gewinnen. Wenn die vorgenannten Autoren wohl auch zum Teil schon solche Versuche mit herangezogen hatten, so trachteten doch noch eine größere Anzahl Forscher, diese Untersuchungen zur Hauptaufgabe zu machen.

Das Filtrat, das W. Koch (10) aus Kulturen auf neutralisierter Hühnerbouillon gewann, rief, Kaninchen und Schafen intravenös injiziert, in größeren Mengen stärkste Dyspnoë hervor, welche mindestens 1 Stunde lang anhielt und eine Temperatursteigerung von 1–2° bedingte. 5 ccm Kulturfiltrat wurden von Nencki (11) bei subkutaner Applikation beim Kaninchen wirkungslos gefunden. Hoffa (12) züchtete Milzbrandbacillen auf Fleischbrei und extrahierte aus dieser Kultur einen alkaloidartigen Körper, das „Anthracin“. Dasselbe war in Mengen von 0,01–0,02 g binnen einer halben Stunde für verschiedene Laboratoriumstiere tödlich. Durch Ammonsulfatfällung aus Kulturen auf Fleischextrakt gelangte Hankin (13) zu einer Albumose, die nur virulente Kulturen geben sollen, welche aggressive Wirkung und infolgedessen auch immunisierende Wirkung besitzen. Popoff (14) sterilisierte 3 Tage hintereinander  $\frac{1}{2}$  Stunde lang Kreatininmilzbrandkulturen, die er angesäuert hatte, und dickte das Filtrat im Wasserbade ein. 1 ccm davon rief beim Kaninchen subkutan keine Vergiftungserscheinungen hervor. Infektionsbegünstigende Eigenschaften seines Kulturfiltrats will Malzew (15) gesehen haben, toxische Wirkung bei subkutaner Injektion bei Kaninchen fand er nicht. Petermann (16) prüfte diese Befunde nach, ohne sie jedoch bestätigen zu können, angeblich, weil er bei zu hohen Temperaturen gezüchtet hat. Nach einem löslichen Gift unter Aufwendung zahlreicher Methoden suchte noch Marmier (17), der seine Kulturen auf Pepton-Glyzerinbouillon anlegte und bei 20° wachsen ließ. Durch Fällern mit Ammonsulfat und nachherige Dialyse oder durch Extraktion mit Glyzerin und Fällern mit Alkohol erhielt er eine Substanz, die häufig schon bei 0,008 g pro kg Tier giftig war. Es trat Temperatursteigerung ein, Diarrhöe, Abmagerung,

Krämpfe, Erstickung, also milzbrandähnliche Symptome. Das Toxin ist hitzebeständig. Auch war damit Immunität zu erzielen.

Auch das eventuelle Vorhandensein eines intracellulären Giftes ist von vielen Forschern zum Gegenstand umfangreicher Untersuchungen gemacht worden.

Nencki erhielt aus Reinkulturen, sowohl aus den Bacillen wie aus den Sporen, eine Albumose, die mit Pflanzenkaseinen und tierischen Schleimstoffen eine Aehnlichkeit hatte. Klemperer (18) fand in ausgekochten Milzbrandkulturen ein Protein, welches bei Tieren Fieber erzeugte. Heim und Geiger (19) züchteten Milzbrandbakterien in Hühneriern und gewannen daraus eine für Mäuse tödliche Substanz. Klein (20) kommt zu der Ansicht, es existiere kein endocelluläres Gift beim Milzbrandbacillus, da Meerschweinchen  $\frac{2}{3}$  Agarkulturen, die durch 5-minütigen Aufenthalt in kochendem Wasser abgetötet waren, ohne jeden Schaden vertragen. Durch die Entdeckung Buchners war dann ein neuer hoffnungsvoller Weg gezeigt. Hahn (21), welcher Milzbrandkulturen auspreßte und das Chamberland-Filtrat Meerschweinchen injizierte, war trotzdem nicht glücklicher als seine Vorgänger. Conradi, der auch auf verschiedene Arten an diese spezielle Frage herantrat, leugnet das Vorhandensein eines Zellgiftes der Milzbrandbakterien. Die Mengen asporogenen Milzbrandes, die Levy und Pfersdorff (22) benötigten, um Mäuse zu töten, sprechen auch nicht gerade für ein starkes Gift in den Bacillen selbst, obwohl diese Forscher es vermieden haben, Hitze zur Abtötung anzuwenden. Vaughan (23) fand die toten Bacillenleiber und ein Extrakt daraus mit 1-proz. Schwefelsäure für Meerschweinchen und Ratten giftig.

Aus den Versuchsergebnissen der bisherigen Untersuchungen geht soviel hervor, daß es trotz der mannigfachsten Methoden nicht gelungen ist, beim Milzbrandbacillus entweder ein lösliches oder ein an den Zellen selbst haftendes Toxin einwandfrei nachzuweisen. Dafür sprechen weniger die Resultate, die eine gewisse Giftwirkung ergaben, als vielmehr diejenigen, welche ein Immunisierungsvermögen der nicht oder kaum Giftwirkungen entfaltenden Kulturfiltrate, deren Fällungsprodukte [Wooldridge (24), Arloing (25), Hankin u. a.] oder der Gewebssäfte [Bail (26)] erhalten haben. Man könnte dann eben annehmen, daß die Gifte rasch abgeschwächt werden und als Toxoide eine gute Immunität hervorrufen. Zudem gibt es Fälle von Milzbrand, die nur als Intoxikation erklärt werden können, weil man bei ihnen nur mit der größten Sorgfalt und dann auch, wie bei den echten Toxikosen, nur an der Infektionspforte den Erreger nachweisen kann. Es war also Grund genug vorhanden,

21\*

nochmals an die Frage der Giftbildung des Milzbrandbacillus heranzutreten trotz der widersprechenden Resultate, welche in überaus zahlreichen Versuchen erhalten worden waren. Am meisten Aussicht auf Erfolg mußten noch die Kulturen geben, da bei der Extraktion von Gewebssäften und Organen soviel Nebenprodukte entstehen, wie wir jetzt wissen, daß sie das Bild einer Giftwirkung aus den Bacillen trüben müssen.

Zu diesen Untersuchungen stellte ich mir zunächst einen asporogenen virulenten Stamm her. Während dies bei einigen Stämmen Schwierigkeiten bot, gelang es bei einem hochvirulenten ziemlich schnell, ihn seiner Sporenbildung zu berauben und ihm doch die Virulenz zu erhalten. Ich versuchte nun durch ein Oberflächenwachstum auf Bouillon möglichst große Bacillenmengen zu bekommen, weil ich annahm, auf diese Weise am besten die natürliche Infektion nachzuahmen, um so die Toxinbildung nachweisen zu können. Die meisten Milzbrandinfektionen verlaufen doch so, daß zunächst ein Temperaturanstieg eintritt, der bis zu  $41^{\circ}$  und darüber geht, dann findet man massenhaft Bacillen im Blut und sämtlichen Organen, kurz vor dem Tode sinkt dann allmählich die Temperatur bis zu  $32^{\circ}$  und wahrscheinlich noch darunter. Danach kommt es also erst zur Ueberschwemmung des Körpers mit Bacillen, wenn das Fieber vorhanden ist; hat sich dann Massenentwicklung der Bacillen eingestellt, dann sinkt die Temperatur plötzlich und das Tier, das eben noch munter erschien, geht unter suffokatorischen Erscheinungen ein. Erst die Massenentwicklung scheint also genügend Gifte gebracht zu haben. Diesen Vorgang wollte ich durch die Massenkulturen in Bouillon nachmachen. Die Oberflächen wurden auf verschiedenen Sorten Bouillon zur Entwicklung gebracht und verschieden lange stehen gelassen.

Wenn ich zuweilen auch schon nach kurzer Zeit, etwa 2 Tagen, bei besonders gut gewachsenen Röhrchen eine ziemliche Giftentwicklung fand, so war die Giftigkeit des Bouillonfiltrats doch meist besser nach längerem Wachstum. Ein Beispiel für ein gutes Gift ist der Verlauf der Injektion bei Kaninchen 16. Die Kultur war 28 Tage alt, als sie verwendet wurde.

Die Röhrchen waren 20 Minuten auf  $65^{\circ}$  erhitzt worden und durch Papierfilter gegossen. Mikroskopisch waren Bacillen nicht nachweisbar.

Das Kaninchen wog 700 g und erhielt 2,0 g intravenös. Nach der Injektion beobachtete man zunächst nur schnellere Atmung. Das Tier saß gestäubt. Es bekam Diarrhöe. Die Temperatur sank 1 Stunde später um 1,5°, 5 Stunden nachher unter 32°, wobei es dann unter Krämpfen starb.

Weniger gute Gifte lieferten eine Reihe anderer Kulturen, deren Toxizität aus folgender Tabelle I ersichtlich ist.

Tabelle I.

Kan. No.	Gewicht g	Behandlung	Sterilisiert durch	Tod nach Tagen
21	720	17. XII. 07 6,0 Bouillonfiltrat 1-täg. Kultur iv.	Toluol	17
3	1200	6. XI. 07 7,0 „ 2 „ „ „	20' auf 65° erhitzt	9
18	800	12. XII. 07 5,0 „ 2 „ „ „	20' „ 65° „	11
13	970	22. XI. 07 10,0 „ 3 „ „ „	10' „ 65° „	
		4. XII. 07 15,0 „ 11 „ „ „	30' „ 65° „	9
4	1800	8. XI. 07 10,0 „ 4 „ „ „	20' „ 65° „	
		4. XII. 07 15,0 „ 11 „ „ „	30' „ 65° „	16
5	1100	8. XI. 07 2,0 „ 4 „ „ „	20' „ 65° „	15
6	1600	8. XI. 07 10,0 „ 4 „ „ „	Chamberland	10
7	1400	8. XI. 07 4,0 „ 4 „ „ „		46
8	1750	8. XI. 07 10,0 „ 4 „ „ „	10' a. 98—100° erh.	27
9	1340	8. XI. 07 2,0 „ 4 „ „ „	dgl.	42
22	720	17. XII. 07 6,0 „ 5 „ „ „	Toluol	7
23	680	17. XII. 07 6,0 „ 5 „ „ „	10' auf 70° erhitzt	6
19	860	16. XII. 07 5,0 „ 6 „ „ „	Toluol	9
20	870	16. XII. 07 2,0 „ 6 „ „ „		4
1	1090	26. X. 07 10,0 „ 8 „ „ „	20' auf 65° erhitzt	4
2	1000	26. X. 07 5,0 „ 8 „ „ „	20' „ 65° „	
		4. XII. 07 10,0 „ 11 „ „ „	30' „ 65° „	16
10	1120	12. XI. 07 20,0 „ 8 „ „ „	20' „ 65° „	3
11	1120	12. XI. 07 5,0 „ 8 „ „ „	20' „ 65° „	
		4. XII. 07 10,0 „ 11 „ „ „	30' „ 65° „	2
24	1020	27. XII. 07 10,0 „ 9 „ „ „	10' „ 70° „	2
25	1020	27. XII. 07 10,0 „ 9 „ „ „	Toluol	3
26	1020	27. XII. 07 10,0 „ 9 „ „ „	Chamberland	7
27	1100	27. XII. 07 12,0 „ 9 „ „ „	sbk. Toluol	18
28	1100	27. XII. 07 16,0 „ 9 „ „ „	ip. Chamberland	9
14	1050	3. XII. 07 10,0 „ 10 „ „ „	iv. 30' auf 65° erhitzt	17
15	870	4. XII. 07 9,0 „ 11 „ „ „	dgl.	11
30	760	31. XII. 07 7,0 „ 15 „ „ „	Toluol	27
31	940	3. I. 08 5,0 „ 16 „ „ „		32
32	900	3. I. 08 10,0 „ 16 „ „ „	60' auf 70° erhitzt	16
33	760	6. I. 08 6,0 „ 17 „ „ „	Toluol	2
16	700	10. XII. 07 2,0 „ 28 „ „ „	20' auf 65° erhitzt	5 Std.

iv. = intravenös, ip. = intraperitoneal, sbk. = subkutan.

Die Tiere, welche erst nach längerer Zeit eingingen, waren abgemagert und zeigten meist Nephritis und Nebennierenrötung, Verdichtungsherde in der Lunge und Entzündungsherde im Darm. Die Kaninchen, welche die Injektionsmenge subkutan erhalten hatten, bekamen Oedem und häufig Nekrosen, blieben aber nicht selten am Leben.

Trotzdem ich die verschiedensten Nährmedien benutzte, die teils aus Rind-, Pferde-, Schweine- und Hundefleisch unter Variierung der Reaktion des Nährbodens, teils mit und ohne Serum und Blutzusatz hergestellt waren, konnte ich doch nicht eruieren, unter welchen Bedingungen das beste Gift gebildet wurde.

Außer einfachen Bouillonfiltraten verwandte ich auch eine Fällungsmethode, die bei anderen echten Toxinen gute Resultate ergibt. Durch Sättigen der filtrierten Bouillonkulturen mit Ammonsulfat erhielt ich häufig ein starkes Gift. Das Ammonsulfat war durch Dialyse entfernt worden, den Niederschlag löste ich meist in einer Portion übriggelassener Bouillon auf. Folgende Versuche mögen ein Beispiel geben.

Kaninchen 41 erhielt am 17. I. 08 in 20 ccm das ausgefällte Gift aus 100 ccm Bouillonfiltrat intravenös. Das Gewicht des Tieres betrug 650 g. Das Tier ist zunächst außer Dyspnoë ganz normal, bekommt nach etwa  $\frac{1}{2}$  Stunde Diarrhöe und geht nach 2 Stunden unter Temperatursenkung und plötzlichen Schreikrämpfen zugrunde. Autopsie: Organe sehr blutreich. Darm gerötet, Milzschwellung. Kaninchen 42 und 43 hatten 2,0 und 5,0 derselben Lösung intravenös erhalten und starben unter denselben Symptomen in 3 und 4 Stunden.

Es war also schon in 10 ccm Filtrat genug Toxin vorhanden, um Kaninchen von 500—600 g akut zu töten. Auch am folgenden Tage konnte mit 0,5 ccm, also aus 2,5 ccm Bouillon, der Tod in derselben Weise bei Kaninchen 48, welches 540 g wog, verursacht werden. Die Kultur war 9 Tage alt gewesen. Während z. B. Diphtheriegift durch  $\frac{3}{4}$ -stündiges Erhitzen auf 70° erheblich abgeschwächt wird, ist dies beim Milzbrandgift nicht der Fall. Kaninchen 47 bekam 2,0 (= 10,0 Bouillon) intravenös; das Gift war während  $\frac{3}{4}$  Stunden auf 70° im Wasserbade gehalten worden und trotzdem hatte es seine giftigen Eigenschaften voll behalten. Das Dialysat, welches die anderen Tiere erhalten hatten, war aus Bouillonfällung gewonnen, die vorher durch Papier filtriert und durch Toluol sterilisiert war. Ein anderes gutes Gift lieferte eine viertägige Kultur, die ebenfalls durch Papier filtriert und durch Toluol sterilisiert war. 10 ccm davon töteten Kaninchen von 600—700 g in mehreren Stunden, die doppelte Menge sofort. In folgender Tabelle mögen noch einige gute Gifte angeführt werden.



Tabelle II.

Kan. No.	Ge- wicht g	Behandlung	Sterilisiert durch	Tod nach
41	650	17. I. 20,0 dialys. Ammonsulfatfällung 9-täg. Kultur iv.	Zentrifugieren	2 St.
42	550	17. I. 2,0 wie 41	"	4 "
43	560	17. I. 5,0 " 41	"	3 "
46	620	18. I. 2,0 " 41	"	2 Tag.
47	580	18. I. 2,0 " 41	<sup>3/4</sup> a. 70° erhitzt	7 St.
48	540	18. I. 0,5 " 41	Zentrifugieren	6 "
49	520	20. I. 0,3 g der getrock. Fällung = 20,0 Zentrifugat wie 41	"	12 "
55	700	12. II. 10,0 Bouillonfiltr. 34-täg. Kult. iv.	Toluol	7 "
55a	560	12. II. 20,0 wie 55	"	2 M.
65	740	2. IV. 9,0 Bouillonfiltrat 22-täg. Kult. iv.	"	3 St.
66	1080	6. IV. 40,0 wie 65 sbk. (Temperatur- sturz tritt nicht ein)	"	3 Tag.
67	1120	6. IV. 40,0 wie 65 ip. (nach 6 Stdn. Temperatursturz)	"	4 "
80	620	1. V. 1,0 Ammonsulfatfällung = 6,0 13- täg. Kultur Bouillonfiltrat iv.	"	6 St.
82	570	8. V. 5,0 Bouillonfiltrat 24-täg. Kult. iv.	"	1 "
83	580	8. V. 1,0 wie 82	"	3 "
105	670	3. XI. 10,0 unfiltrierte Bouillon 6-täg. Kultur iv.	Zentrifugieren	7 "
107	560	11. IX. 10,0 Bouillonfiltr. 17-täg. Kult. iv.	Toluol	7 "

iv. = intravenös, ip. = intraperitoneal, sbk. = subkutan.

Durch Erhitzen auf 98—100° wird das Gift doch so abgeschwächt, daß es erst chronisch krank macht und dann zum Tode führt (Kaninchen 60, 64).

Auch aus Kulturen von sporenbildenden Milzbrandbacillen vom Rind, Pferd und Schwein lassen sich im Filtrat Gifte nachweisen, welche Fieber erzeugen, was ja auch vielfach in der Literatur beschrieben ist. 20 ccm Subtilisfiltrat, die Kultur war auf derselben Bouillon gezüchtet, machten nicht die geringste Temperaturstörung. Es sind also nur quantitative Unterschiede zwischen den Bouillonfiltraten von asporogenen und sporogenen Milzbrandkulturen vorhanden.

Ich ging nun daran, die anderen Eigenschaften des gefundenen löslichen und fällbaren Giftes zu untersuchen. War dieses Gift spezifisch, so mußte es in irgendeiner Weise auf die Infektion mit dem Milzbrandbacillus einwirken, indem es entweder den damit behandelten Tieren Schutz verlieh oder auch die Infektion begünstigte. Eine Immunität konnte ich im Gegensatz zu Arloing fast nie erreichen, obwohl ich es auch einige Male vermieden habe, die Kulturen zu erhitzen

oder zu filtrieren, wobei Schädigungen hätten vorkommen können.

Tabelle III.

Kan. No.	Gewicht g	Behandlung	Infektion	Resultat
150	1060	13. VII. 10,0 Bouillonkultur mit Bac. 32-täg. auf 70° erhitzt iv.	17. VIII. $\frac{1}{10000}$ Oese 1-täg. Kult. sbk. dgl.	19. VIII. tot
151	1120	17. VII. 5,0 wie 150 28. VII. 10,0 dgl.		20. VIII. tot
152	850	17. VII. wie 151	"	19. VIII. tot
153	1180	17. VII. " "	"	20. VIII. tot
154	980	17. VII. " " 28. VII. 10,0 dgl.	"	dgl.
155	870	17. VII. wie 151 28. VII. 10,0 dgl.	"	"
156	1020	17. VII. wie 151 28. VII. 10,0 dgl.	"	"
157	1020	17. VII. wie 151 28. VII. 10,0 dgl.	"	19. VIII. tot
158	1140	17. VII. wie 151 28. VII. 10,0 dgl.	"	20. VIII. tot
159	1150	17. VII. wie 151 28. VII. 8,0 dgl.	"	dgl.
160	1350	17. VII. wie 151 28. VII. 10,0 dgl.	"	lebt
161	1250	17. VII. wie 151 28. VII. 6,0 dgl.	"	20. VIII. tot
162	1260	17. VII. wie 151 28. VII. 10,0 dgl.	"	dgl.
163	1150	Kontrollen	"	19. VIII. tot
164	1350		"	dgl.
165	1220		"	"
177	1300	10. IX. 8,0 Bouillonfiltrat 13-täg. Kultur 1 Std. auf 60° erhitzt	8. XII. $\frac{1}{10000}$ Oese 1-täg. Kult. sbk.	11. XII. tot
178	1300	20. X. 15,0 dgl. 15. XI. 15,0 Bouillonfiltrat 18-täg. Kultur 1 Std. auf 60° erhitzt iv.	dgl.	dgl.
180	1370	20. X. 20,0 wie 177 sbk. 30. X. 30,0 dgl.	"	"
181	1300	20. X. 10,0 wie 177 sbk. 30. X. 15,0 dgl.	"	10. XII. tot
182	1350	20. X. 5,0 wie 177 sbk. 21. X. 10,0 dgl. 22. X. 15,0 dgl.	"	dgl.
183	1400	20. X. 5,0 wie 177 sbk. 21. X. 10,0 dgl. 22. X. 20,0 dgl.	"	lebt
184	1350	20. X. } 21. X. } wie 183 22. X. }	"	10. XII. tot
185	1500	20. X. 20,0 wie 178 sbk. 30. X. 30,0 dgl.	"	11. XII. tot
186	1250	20. X. 10,0 wie 178 sbk. 30. X. 20,0 dgl.	"	dgl.

Kan. No.	Ge- wicht g	Behandlung	Infektion	Resultat
187	1370	20. X. 5,0 wie 178 sbk. 21. X. 10,0 dgl. 22. X. 15,0 "	8. XII. $\frac{1}{10000}$ Oese 1-täg. Kult. sbk.	18. XII. tot
188	1450	20. X. 5,0 wie 178 sbk. 21. X. 10,0 dgl. 22. X. 20,0 "	dgl.	16. XII. tot
190	1350	} Kontrollen	"	11. XII. tot dgl.
193	1590			
201	1050	10. VII. 2,0 Gift VII iv.; 11. VII. 3,0 dgl.; 13. VII. 4,0 dgl.; 14. VII. 6,0 dgl.	15. VII. $\frac{1}{400}$ Oese 1-täg. Kult. sbk.	17. VII. tot
202	1080	10. VII. 2,0 Gift VII iv.; 11. VII. 3,0 dgl.; 13. VII. 5,0 dgl.; 14. VII. 6,0 dgl.	dgl.	dgl.
203	990	wie 201	"	"
204	930	10. VII. 1,0 Gift VII iv.; 11. VII. 2,0 dgl.; 13. VII. 3,0 dgl.; 14. VII. 4,0 dgl.	"	"
205	1050	} Kontrollen 10. VII. 1,0 N-Bouillon iv.; 11. VII. 3,0 dgl.; 13. VII. 4,0 dgl.; 14. VII. 6,0 dgl.	"	16. XII. tot  dgl.
206	1000			
94	1070	10. VI. 2,0 Gift VI iv.	"	18. VII. tot
95	1050	10. VI. 5,0 Gift VII iv.	"	17. VII. tot
96	670	11. VI. 6,0 Gift VI iv.	"	dgl.

iv. = intravenös, sbk. = subkutan; Gift VII = Bouillonfiltrat 37-täg. Kultur, Gift VI = Bouillonfiltrat 24-täg. Kultur.

Eine die Infektion begünstigende Wirkung konnte ich deshalb nicht ausführen, weil selbst  $\frac{1}{10000}$  Oese meiner Kulturen genügten, die Kaninchen innerhalb 24—48 Stunden zu töten.

Nach dem Ausfall dieser Versuche war es nicht wahrscheinlich, daß Serum von Hunden und Ziegen, die mit steigenden Mengen von dem in den Kulturen gefundenen Gifte geimpft worden waren, irgendwelchen Schutz gegen eine Bacilleninfektion verleihen würden.

Von mehreren Ziegen konnte ich nur eine längere Zeit behandeln, und zwar hatte ich hier mit subkutanen Injektionen begonnen und bin dann erst zu intravenösen übergegangen. Das Tier hatte bis zu 200 ccm Bouillongift intravenös vertragen. Es war so hoch immunisiert, daß es 200 ccm eines Giftes vertrug, von dem 1,0 ccm genügte, ein Kaninchen von 600 g in 3 Stunden zu töten, ohne darauf auch nur mit Fieber zu

reagieren. Trotzdem ging diese Ziege dann auch bei intravenöser Einspritzung von weiteren 200 ccm eines Giftes, das auch nicht viel stärker war als die vorher angewandten, unter Temperatursturz innerhalb weniger Stunden zugrunde. Sie hatte also keine echte Immunität bekommen, nur eine höhere Resistenz. Dementsprechend fielen auch die mit ihrem Serum angestellten Impfversuche gegen Bacilleninfektion aus.

Tabelle IV.

Kan. No.	Gewicht g	Behandlung	Infektion	Resultat
207	1000	14. VII. 10,0 Ser. v. Hund III iv.	15. VII. $\frac{1}{500}$ Oese 1-täg. Kultur sbk.	17. VII. tot
208	950	14. VII. 6,0 „ wie 207	dgl.	dgl.
209	1100	14. VII. 4,0 „ „ 207	„	„
210	1100	14. VII. 2,0 „ „ 207	„	„
211	1150	14. VII. 10,0 „ v. Ziege XI iv.	„	18. VII. tot
212	850	14. VII. 4,0 „ wie 211	„	17. VII. „
Kontrollen siehe Kaninchen 205 und 206 in Tabelle III.				
166	1020	23. VIII. 2,0 N-Hundeser. iv.	24. VIII. $\frac{1}{10000}$ Oese 1-täg. Kultur sbk.	26. VIII. tot
167	1040	23. VIII. 5,0 wie 166	dgl.	27. VIII. „
168	1070	23. VIII. 10,0 „ 166	„	28. VIII. „
169	1170	23. VIII. 2,0 Ser. v. Hund X v. 20. III. iv.	„	27. VIII. „
170	940	23. VIII. 5,0 wie 169	„	27. VIII. „
171	920	23. VIII. 10,0 „ 169	„	30. VIII. „
172	1130	31. VIII. 10,0 N-Hundeser. iv.	1. IX. dgl.	4. IX. „
173	1100	31. VIII. 10,0 Ser. v. Hund X v. 3. VIII. iv.	„	lebt
174	1070	31. VIII. 9,0 wie 173	„	3. IX. „
175	1100	31. VIII. 5,0 „ 173	„	4. IX. „
176	720	31. VIII. 2,0 „ 173	„	4. IX. „

iv. = intravenös; sbk. = subkutan; N-Hundeserum = normales Hundeserum.

Vom Rauschbrand ist es durch die Untersuchungen von Schattenfroh und Grassberger bekannt, daß er ein Gift bildet, mit dem man gegen das Gift immunisieren und auch ein Serum gewinnen kann, das antitoxischen Wert hat. Gegen die Infektion ist dieser Schutz aber auch nicht gerichtet. Es erhob sich nun die Frage, ob dies vielleicht auch beim Milzbrand der Fall sei. Andererseits war es auch deshalb nötig, solche Versuche vorzunehmen zur Entscheidung, ob das von mir gefundene Toxin zu den echten Giften zu rechnen sei, d. h. ob ein damit hergestelltes Serum dem ge-

forderten Gesetze der Multipla folge und entsprechend genüge. Es wurden nun sowohl Versuche mit schwächeren Giften als auch mit den stärksten Giften vorgenommen, ohne daß es mir gelungen ist, mehr als eine gewisse Resistenz gegen das Gift zu erreichen. Auch die Serumversuche brachten mir keine besseren Ergebnisse, meist war der Temperatursturz bei der versuchten Neutralisation mit Serum bei den damit behandelten Tieren geringer, doch kam dies schon öfter mit Normalserum vor, aber die Tiere konnten nicht vor dem Tode bewahrt werden.

Tabelle V.

Kan. No.	Ge- wicht g	Behandlung	Temperatur	Resultat
84	520	9. V. 10,0 Gift V + 1,0 Ser. Hund III (1 Tag bei 37°) iv.	kein Temperatursturz	19. V. tot
85	630	9. V. wie 84	um 0,6° gesunken	25. V. „
86	630	9. V. 10,0 Gift V + N-Hunde- serum 1,0 iv.	„ 0,7° „	30. V. „
87	680	9. V. 5,0 Gift V iv.	Temperatursturz und Tod	
88	520	15. V. 2,0 „ V „	Temperatursturz	16. V. tot
89	610	15. V. 8,0 „ V + 0,5 N-Hunde- serum iv.	um 1,1° gesunken	24. V. „
90	610	15. V. 8,0 Gift V + 0,5 Ser. Hund III iv.	„ 0,3° „	25. V. „

iv. = intravenös; Gift V = Bouillonfiltrat 24-tägiger Kultur; N-Hundeserum = normales Hundeserum.

Das Hundeserum stammte von einem Tiere, das sowohl größere Mengen subkutan als auch intravenös vertragen hatte, zuletzt eine Dosis, an der zwei andere Hunde, die ebenfalls immunisiert waren, zugrunde gegangen sind.

Nach den Untersuchungen von Spiro haben Harnstofflösungen die Fähigkeit, Eiweiß aufzulösen. Ich versuchte daher, meine asporogenen Bacillen mittels Harnstofflösungen zu schütteln, um auf diese Weise zu einem Körper zu gelangen, wie ich ihn aus Diphtheriebacillen hergestellt hatte und mit dem ich bei Kaninchen ein 50-faches antitoxisches Diphtherieserum bekommen hatte. Nach 6-tägigem Schütteln in 25-proz. Harnstofflösung bei 37° waren die asporogenen Milzbrandbacillen bei einem Verhältnis 1:100 sicher abgetötet. Um die Giftigkeit der Schüttelextrakte untersuchen zu können, mußte ich den Harnstoff durch Dialyse entfernen, was ja auch

unbedenklich geschehen konnte, da wir ja wissen, daß sowohl die Toxine wie die Endotoxine hochmolekulare Körper vorstellen, welche die tierische Membran nicht passieren, beim Milzbrand hatte ich dies speziell nochmals bei meinen Bouillongiften nachgewiesen. Ich wollte nun sehen, ob durch das tagelange Schütteln giftige Substanzen in die Harnstofflösung übergetreten waren und ob die Bacillen an und für sich giftig sind. Wie aus Tabelle VI ersichtlich ist, sind nur die Bacillen selbst toxisch, während der Extrakt zum mindesten sehr wenig Gift enthält. Zur Herbeiführung des Temperatursturzes und Todes braucht man subkutan etwa 4mal, intra-peritoneal 2mal soviel wie intravenös. Dasselbe Verhältnis besteht auch bei den verschiedenen Einverleibungsarten mit dem Bouillonkulturgift.

Tabelle VI.

Kan. No.	Gewicht g	Injektion	Temperatur	Weiteres Resultat
251	1500	15. XII. 120 mg Ur.-Asp. dialys. iv.	um 1° gesunken	bleibt leben
252	650	15. XII. 180 mg wie 251 sbk.	„ 2,8° „	dgl.
253	680	15. XII. 150 „ „ 251 ip.	Temperatursturz	nach 2 Stunden tot
254	820	15. XII. 70 „ „ 251 iv.	„ 22 „ „	„ 22 „ „
255	720	15. XII. 180 „ „ 251 sbk.	um 2,1° gesunken	bleibt leben
256	1130	18. XII. 200 „ „ 251, 4 Tage dialys. iv.	Temperatursturz	dgl.
257	930	18. XII. wie 256	.	n. 2 Min. unter Krämpfen †
258	730	18. XII. 100 mg wie 256	.	n. 10 Min. dgl.
259	900	18. XII. wie 258	Temperatursturz	bleibt leben
261	720	18. XII. 40 mg wie 256	um 0,9° gesunken	29. XII. tot

## Meerschweinchen.

17	390	5. I. 200 mg wie Kan. 256 sbk.	.	9. I. tot, starkes Infiltrat
21	420	dgl.	.	8. I. „ Nekrose
22	320	„	.	13. I. „ ausgedehnte Nekrose
26	350	5. I. 200 mg Asp. m. Chloroform abgetötet sbk.	.	27. I. tot, Infiltrat
27	450	5. I. 100 mg wie 26	.	10. I. dgl.

iv. = intravenös; sbk. = subkutan; Ur.-Asp. = mit 25-proz. Harnstofflösung abgetötete asporogene Bacillen; Asp. = asporogene Bacillen.

Diejenigen Tiere, welche sich nach der Injektion größerer Mengen wieder erholt hatten und die, welche kleinere Mengen während einmaliger oder zweimaliger Vorbehandlung bekommen hatten, wurden zur Prüfung einer etwaigen erhaltenen Im-

munität mit virulenten Bacillen geimpft. Doch verliefen auch diese Schutzimpfungsversuche in negativem Sinne.

Tabelle VII.

Kan. No.	Gewicht g	Behandlung	Infektion	Resultat
251	1500	15. XII. 120 mg Ur.-Asp. iv.	30. XII. $\frac{1}{1000}$ Oese 1-täg. Kultur sbk.	2. I. tot
252	650	15. XII. 180 mg wie 251 sbk.	dgl.	dgl.
255	720	15. XII. wie 252	"	"
256	1130	15. XII. 200 mg wie 251 iv.	"	"
260	720	18. XII. 60 " " 256	"	3. I. tot
228	720	} Kontrollen	"	2. I. tot
229	820		"	dgl.
262	1400		"	"
263	1300		"	"
			"	"
Meerschweinchen.				
16	380	5. I. 200 mg wie 256 sbk.	25. II. $\frac{1}{1000}$ Oese 1-täg. Kultur sbk.	27. II. tot
18	330	5. I. 200 " " 16	dgl.	dgl.
		27. I. 200 " " 16		
19	320	5. I. 50 " " 18 sbk.	"	"
		27. I. 100 " " 18		
20	350	5. I. 100 " " 18 "	"	"
		27. I. 200 " " 18 "		
23	340	5. I. 50 " " 18 "	"	"
		27. I. 100 " " 18 "		
24	320	5. I. 100 " " 18 "	"	"
		27. I. 200 " " 18 "		
25	500	5. I. 80 " " 18 "	"	"
		27. I. 129 " " 18 "		
26a	500	27. I. 150 mg Asp. mit Chloroform abgetötet sbk.	"	"
28	530	} Kontrollen	"	"
29	670		"	"
30	620		"	"

iv. = intravenös; sbk. = subkutan; Ur.-Asp. = mit 25-proz. Harnstofflösung abgetötete asporogene Bacillen; Asp. = asporogene Bacillen.

Bisher habe ich hauptsächlich Versuche mitgeteilt, welche mit Kaninchen, bei den Harnstoffversuchen außerdem mit Meerschweinchen angestellt waren. Wie aus meinen Serumversuchen hervorgeht, hatte ich noch Hunde und Ziegen benutzt, die ebenso wie Meerschweinchen durch das Bouillongift beeinflußt wurden. Interessant war ein Versuch mit zwei Schweinen. Bekanntlich haben die milzbrandkranken Schweine hauptsächlich Lokalerscheinungen an der Zunge und im Darm. Da sie auch an Milzbrand sterben, konnte man annehmen, daß entweder das Schwein besonders empfänglich sein müsse

für das Milzbrandtoxin oder der Bacillus im Schweineorganismus ein besonders gutes Gift bildet. Ersteres ist nun nicht der Fall. Die Schweine wurden bei derselben Dosis und demselben Gewicht ebenso krank wie Hunde unter denselben Bedingungen. Da man die zweite Annahme einer stärkeren Giftbildung — auf Schweinefleischbouillon wurden bessere Gift nicht erzielt — nicht beweisen kann, bleibt nur übrig, daß das Schwein nicht akut, sondern chronisch der Milzbrandinfektion erliegen müßte, was ja auch der Fall zu sein scheint, da apoplektiforme Fälle, ohne daß auch Bacillen im Blute gefunden werden, kaum vorkommen dürften, wie dies ja auch nur so bei anderen empfänglichen Tieren der Fall ist. Bei Schweinen handelt es sich gewöhnlich um Not-schlachtungen, wo bloß lokaler Milzbrand festgestellt wird.

Tabelle VIII.

No.	Gewicht	Injektion	Temperatur	Weiteres Resultat
M. 21	300 g	12. II. 10,0 Bouillonfiltrat vom 7. I.—2. II. sbk.	Temperatursturz	13. II. schlapp, infiltriert, Gew. 260 g. 23. II. tot
M. 22	280 „	12. II. 10,0 idem ip.	„	13. II. schlapp, Gewicht 250 g. 17. II. tot
M. 23	436 „	13. III. 1,0 Bouillonfiltrat v. 7. I.—20. II. iv.	um 2° gesunken	6. III. tot
M. 24	800 „	14. III. 4,0 wie M. 21 iv.	um 1,5° gesunken	16. III. Gewicht 660 g. 11. IV. tot.
M. 28	700 „	6. IV. 15,0 Bouillonfiltrat v. 9. III.—31. III. iv.	Temperatursturz	nach 10 Min. Krämpfe und Tod.
M. 29	780 „	7. IV. 5,0 Gift idem iv.	„	8. IV. morgens tot
M. 34	300 „	30. IV. 20,0 Bouillonfiltrat 14. IV.—27. IV. sbk.	„	5. V. Nekrose. Gewicht 200 g. 8. V. tot
M. 36	250 „	30. IV. 10,0 Gift idem sbk.	„	5. V. Infiltrat. Gewicht 200 g. 6. V. tot
M. 61	200 „	26. I. 4,0 Bouillonfiltrat 5. VI.—24. VII. iv.	—	sof. tot. Lungenblähung.
M. 62	200 „	26. I. 2,0 idem iv.	—	nach 1 Minute tot. Lungenblähung
M. 63	200 „	26. I. 1,0 idem iv.	nach 2 Std. 25°	Sprünge. Erholt sich wieder. 27. I. tot.
Z. 11	34 kg	29. VI. 200,0 Bouillonfiltrat 2. V.—9. VI. iv.	Temperatursturz	nach 3 Stunden tot, unter Zuckungen
H. 4	44 „	19. VI. 200,0 Gift idem iv.	nach 1 Std. 41°, nach 4 Std. 35°	nach 5 Stunden tot
H. 5	34 „	4. IX. 20,0 Gift idem im.	nach 3 Std. um 1° gestiegen	Schwellung. Bleibt leben
Schw. 1	34 „	4. IX. 20,0 „ „ iv.	nach 2 Std. 40°	bleibt leben
Schw. 2	40 „	4. IX. 40,0 „ „ iv.	„ 2 „ 40,4°	„ „

M. = Meerschweinchen, Z. = Ziege, H. = Hund, Schw. = Schwein;  
sbk. = subkutan, ip. = intraperitoneal, iv. = intravenös, im. = intramuskulär.



Ich konnte durch meine Untersuchungen zeigen, daß in geeigneter Bouillon asporogener Milzbrandkulturen eine giftig wirkende Substanz nachzuweisen ist, die einige Bedingungen eines echten Bacillengiftes erfüllt, die Dosen sind nicht zu große und das Bild der Intoxikation ist ein der Milzbrandinfektion ähnliches. Daß das Gift zum Teil chronisch den Tod der Versuchstiere herbeiführt, ist kein Gegengrund, da vielfach Lähmungen an mit Serum behandelten Milzbrandtieren beobachtet wurden, die dann auch noch zugrunde gingen. Im übrigen bewirken Mengen, die subkutan den langsamen Tod bedingen, bei intravenöser Injektion den akuten oder subakuten Tod. Gegen die Spezifität spricht nur der Umstand, daß es nicht regelmäßig gelingt, mit diesem Gift gegen die Infektion zu schützen und auch nur ein geringer Schutzwert, eine erhöhte Resistenz, die wir nicht zur echten Immunität zählen, gegen das Gift selbst sich erreichen läßt. Es erhebt sich nun die Frage, ob dieses Gift überhaupt bei der Infektion eine Rolle spielt und ob die Fälle, welche nur lokales Wachstum der Milzbrandbacillen aufweisen, mit Hilfe des gefundenen Giftes zu erklären sind. Rekapitulieren wir die Wirkung des von mir gefundenen löslichen Giftes. In kleinen Mengen, schon 2,5 ccm Bouillonfiltrat, ruft es bei Kaninchen von 500—600 g bei intravenöser Applikation einen Temperatursturz und subakuten Tod hervor, die doppelte bis dreifache Menge verursacht sofortigen Tod unter suffokatorischen Erscheinungen mit dem Bilde des anaphylaktischen Shocks. Intraperitoneal einverleibt, sind ungefähr die doppelten Mengen nötig zur Herbeiführung derselben Erscheinungen. Bei denselben Mengen tritt der Tod viel später, oft nach Wochen ein und statt eines Temperatursturzes sehen wir eine Temperatursteigerung. Subkutan injiziert sind etwa 4-fache Mengen nötig, um Temperatursturz herbeizuführen, der Tod tritt erst meist nach Wochen ein, bei denselben Mengen wie intravenös bekommt man eine Temperatursteigerung und lokales Oedem, das zur Nekrose führen kann (Arthus'sches Phänomen). Mit den Bacillenleibern selbst sind dieselben Symptome auszulösen, und zwar bei asporogenen Bacillen in gleicher Menge wie mit sporenhaltigen Bacillen. Zur sofortigen Tötung eines Meerschweinchens von 200 g braucht man 10 mg asporogenen

Milzbrand oder 10 mg sporenhaltiges Material aus 2-tägigen Agarkulturen, die vorher völlig getrocknet waren. Für das Kaninchen liegen die Verhältnisse pro Kilogramm Körpergewicht ungünstiger. Man braucht also vom Bakterienmaterial verhältnismäßig mehr als vom Kulturfiltrat. Dies liegt daran, daß im Filtrat das fertige Gift injiziert wird, während bei der Injektion von Bacillen der Körper zuerst das Gift bilden muß; nun verstehen wir auch, warum bei der Bacilleninjektion der Tod bei intravenöser Einverleibung rascher eintritt als bei intraperitonealer und subkutaner Einverleibung, wo die Resorptionsverhältnisse andere sind, worauf ich noch später zurückkommen werde. Soll das von mir gefundene Gift nun eine Rolle bei der Milzbrandinfektion spielen, so müssen wir die Bacilleninfektion zugrunde legen. Zunächst tritt doch bei der natürlichen Milzbrandinfektion Fieber auf, dies hätte sein Gegenstück in der fiebererzeugenden Wirkung geringer Giftmengen, was ja mit der natürlichen Infektion übereinstimmt, wir finden beim Milzbrandfieber des Kaninchens nur spärlich Bacillen im Blute. Das Fieber führt nun zu einem Eiweißzerfall, dessen Abbauprodukte auch giftig wirken. Diese giftigen Eiweißzerfallprodukte zusammen mit den Endotoxinen der Milzbrandbacillen begünstigen nun ein Massenwachstum der Bacillen, dessen Gifte jetzt den Temperatursturz und Tod herbeiführen. Kommt es nicht zur Massenentwicklung der Bacillen im Blute, so genesen auch vielfach die Tiere wieder. Der Grund ist wohl der, daß zu geringe Mengen Bacillen vorhanden waren, um hohes Fieber zu erzeugen und nun die unterstützenden Zerfallsprodukte des Eiweißes auch fehlen. Andererseits wissen wir, daß bei den Fällen, bei welchen wir die Erreger nur an der Infektionspforte finden, der Tod erst nach einem chronischen Verlauf der Krankheit eingetreten ist. Wir hätten hier also dieselben Tatsachen, wie wir sie bei subkutaner Einverleibung der abgetöteten Bakterien oder deren Bouillongiften finden. Ich glaube so auch eine Erklärung dafür zu haben, warum im immunen Tiere trotz der häufig vorhandenen lebenden virulenten Bacillen der Tod nicht eintritt. Es kommt beim immunen Tiere oder bei der Serumbehandlung nicht zu anhaltendem starken Fieber und gegen die geringen Mengen Milzbrandgiftes besteht eine gewisse Gift-

festigkeit, wie wir sie ja auch in meinen diesbezüglichen Versuchen gesehen haben.

Meine Annahme, daß bei der Infektion auch die Eiweißzerfallprodukte eine Rolle spielen, stützt sich auf folgende experimentelle Grundlage. Injiziert man einem Meerschweinchen von 200 g 5—6 ccm einer 1-proz. Peptonbouillon intravenös, so stirbt das Tier unter denselben Erscheinungen wie bei Injektion von 1—2 ccm meines Milzbrandgiftes oder von 10 mg getrockneter Bacillen. Benutzt man nun verschiedene Bouillonsorten, die ohne Zuhilfenahme von Pepton unter Ansäuerung aus der mehrfachen Menge Fleisch oder Organen (aus der Lunge und den weißen Blutkörperchen läßt sich so ein viel stärkeres Gift abspalten als aus Muskelfleisch, anderen Organen und dem Serum), wie sie gewöhnlich zur Bouillonbereitung genommen wird, so ändern sich die quantitativen Verhältnisse. Man bekommt nach Neutralisation eine Lösung, die in denselben Mengen Meerschweinchen unter den oben genannten Symptomen tötet, wie wenn man in demselben Verhältnis von Eiweiß zu Wasser Streptokokken zu Wasser verwendet, und erreicht dasselbe, wie durch Kochen von Säuren mit geringeren Mengen Milzbrandbakterien. Noch giftiger als letztere sind die Spaltprodukte aus Diphtheriebacillen. Wir erhalten also eine Skala der gewonnenen Giftigkeit, die bei dem Diphtheriebacillus am größten ist, beim Milzbrand kleiner wird und bei den Streptokokken, bei welchen auch sonst mit keiner Methode ein Gift nachgewiesen werden konnte, ist die Giftigkeit gleich der aus gewöhnlichem Körpereiweiß gewonnenen. Es ist nicht ungerechtfertigt, anzunehmen, daß die auf diese Weise gewonnenen Gifte nahe verwandt sind mit den in der Bouillon nachgewiesenen Toxinen. Da die Symptome bei allen erwähnten Giften die gleichen sind, so ist es nicht unwahrscheinlich, daß das bei der Infektion tödliche Gift sowohl aus Bakterien (sei es mit, sei es ohne Komplement) als aus Zerfallsprodukten des Eiweißes entsteht.

Ich glaube auch, daß die Bouillonfiltrat-, Bacillen- und Kochgifte dieselben sind wie die im Körper gebildeten, weil die Symptome genau so sind wie bei der Anaphylaxie und

wie sie Friedberger (27) in vitro mit Meerschweinchen-serum und Bakterien oder Eiweiß gefunden hat und Anaphylatoxin genannt hat. Dieser Autor ist der Meinung, daß sich dieses Gift auch im Organismus bei der Infektion aus den verschiedensten Krankheitserregern bildet und die wesentlichen Symptome der Krankheit bedingt. Er hält das Anaphylatoxin aus den verschiedensten Bakterien in seiner Wirkung für einheitlich und glaubt, daß der verschiedene Verlauf der Infektionskrankheiten nur durch das verschiedene biologische Verhalten der Erreger verursacht wird. Die Hauptsymptome, wie Fieber, Einwirkung auf das Zentralnervensystem und Gewebsentzündung, kehren ja bei den einzelnen Infektionskrankheiten immer wieder, wenn auch in verschiedener Intensität; „nur wenige Töne im Grunde, aus denen durch die mannigfachsten Variationen die verschiedenartigsten Melodien entstehen“. Ein lösliches Gift ohne Zuhilfenahme von Komplement, das unter den klassischen Symptomen der Anaphylaxie tötet, hat Aronson (28) zuerst gewonnen, indem er Typhusbacillen bei 65° extrahierte. Nach der Friedbergerschen Methode haben dann auch Schütze (29) und Aronson aus Milzbrandbacillen mittels Meerschweinchen-serum ein Abbauprodukt erhalten, wie ich es in meinem Kulturfiltrat von asporogenen Milzbrandbacillen gefunden habe. Nach Injektion von 1—2 ccm guten Bouillonmilzbrandgiftes in das Blut gehen Meerschweinchen nach einigen Minuten unter Sprüngen mit Zuckungen zugrunde. Das Sektionsbild zeigt Lungenblähung, meist mit Lungenblutungen bei noch schlagendem Herzen. So ist es nun auch erklärlich, warum man immerhin große Bacillenmengen zur selben Todesart braucht, weil eben das Gift aus den Milzbrandbacillen durch das im Serum enthaltene Ferment erst frei gemacht werden muß, ein Vorgang, der das Gift rasch bildet, welches aus den Bacillen in der Bouillon erst nach längerer Zeit in Lösung geht. Ich glaube daher zu der Annahme berechtigt zu sein, daß mein Kulturgift dasjenige ist, welches bei der Milzbrandinfektion eine Rolle spielt. Weiter glaube ich bewiesen zu haben, daß der Milzbrandbacillus kein echtes Toxin bildet, sondern nur ein Endotoxin (dieses wird vielleicht durch das im Serum befindliche Ferment bei der Infektion weiter abgebaut), welches ich in Bouillon und durch Kochen von

Bacillen in angesäuertem Wasser<sup>1)</sup>, am besten unter Druck, leicht gewinnen konnte.

### Zusammenfassung.

1) Die Milzbrandbacillen bilden ein Endotoxin, das sich in großen Mengen in Bouillon von Kulturen von asporogenen Milzbrandbacillen und durch Kochen von Milzbrandbacillen mit Säuren nachweisen läßt. Die Symptome, welche das Endotoxin hervorruft, sind dieselben, wie wir sie bei dem Anaphylatoxin, nach der Friedbergerschen Methode gewonnen, oder bei Typhusbacillen nach Aronson durch Extraktion bei 65° im Tierversuch kennen lernten. Im Urin der Tiere, welche den Shock, den das Gift intravenös in geeigneten Dosen hervorruft, überstehen, tritt ebenso wie bei der Anaphylaxie nach Vorbehandlung und der Anaphylatoxinvergiftung ein starkes Gift auf. Es ist also das von mir gefundene Endotoxin der Milzbrandbacillen, wenn nicht identisch, so doch nahe verwandt mit dem mittels Komplement aus den Milzbrandbacillen abgespaltenen Gift.

2) Durch längeres Stehen im Tageslicht bei gewöhnlicher Temperatur verliert das Milzbrandgift rasch seine toxische Wirkung, ohne daß das immunisierende Vermögen verstärkt würde. In gefrorenem Zustande behält es mindestens 2 $\frac{1}{2}$  Jahre lang seine volle Wirksamkeit.

3) Das Milzbrandtoxin ist hitzebeständig, auch Kochhitze zerstört nicht völlig seine Giftigkeit.

4) Wie mit den Endotoxinen anderer Bakterien, lassen sich auch mit dem Milzbrandgift keine Antitoxine im Blute der damit behandelten Tiere gewinnen. Es kann nur eine gewisse Giftfestigkeit erreicht werden.

5) Auch in Kulturen von sporenbildenden Milzbrandbacillen ist das Gift vorhanden, wie es ja auch in sporenhaltigen Milzbrandbakterien nachweisbar ist. Es ist in den

---

1) Anmerkung bei der Korrektur: Dies erinnert an die Versuche von Sachs und Kyes, Morgenroth über die Koktostabilität der echten Toxine in saurer Lösung, sowie an die von Friedberger und A. Morreschi ermittelte Hitzebeständigkeit des Anaphylatoxins bei der gleichen Reaktion.

Bouillonkulturen der Sporenbildner nur in viel geringerer Menge vorhanden, so daß es, Tieren injiziert, nur Fieber erzeugt, was vor mir bereits von vielen Forschern gefunden war. Die Unterschiede sind nur quantitative.

#### Literatur.

- 1) Pasteur und Joubert, Compt. rend. de l'Acad. des Sciences, 1877.
- 2) Tatarski, Ref. Jahresber. der Vet.-Med., 1887.
- 3) Martin, Proc. Royal Soc. 1890 und zit. nach Conradi.
- 4) Balp und Carbone, zit. nach Conradi.
- 5) Landi, Le Bulletin méd., 1891.
- 6) Brieger und Fränkel, Berl. klin. Wochenschr., 1890.
- 7) Conradi, Zeitschr. f. Hygiene, Bd. 37, 1899.
- 8) Levy und Beckmann, Centralbl. f. Bakteriол., Bd. 43, 1906.
- 9) Sanarelli, Annales Pasteur, T. 7, 1893.
- 10) Koch, Milzbrand und Rauschbrand, Stuttgart 1886.
- 11) Nencki, Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1884.
- 12) Hoffa, Langenbecks Archiv, Bd. 34.
- 13) Hankin, Brit. med. Journ., 1889 u. 1890; Centralbl. f. Bakteriол., 1891.
- 14) Popoff, Centralbl. f. Bakteriол., 1890.
- 15) Malzew, zit. nach Conradi.
- 16) Petermann, Annales Pasteur, 1892.
- 17) Marmier, ibidem, 1895.
- 18) Klemperer, Zeitschr. f. klin. Med., 1892.
- 19) Heim und Geiger, Heim, Lehrbuch der Bakteriол., 1894.
- 20) Klein, Centralbl. f. Bakteriол., 1894.
- 21) Hahn, Münch. med. Wochenschr., 1897.
- 22) Levy und Pfersdorff, Deutsche med. Wochenschr., 1902.
- 23) Vaughan, Centralbl. f. Bakteriол., Bd. 34, Refer.
- 24) Wooldridge, Du Bois Arch., 1888.
- 25) Arloing, Bull. médic., 1892; Compt. rend. de l'Acad., 1892.
- 26) Bail, Centralbl. f. Bakteriол., Bd. 37.
- 27) Friedberger, Zusammenfassende Uebersicht über Anaphylaxie. Fortschritte der deutsch. Klinik, Bd. 2.
- 28) Aronson, Berl. klin. Wochenschr., 1912.
- 29) Schütze, Berl. klin. Wochenschr., 1911.

*Nachdruck verboten.*

[Aus dem Staatlichen Hygienischen Institut zu Hamburg; Direktor: Prof. Dr. Dunbar (Abteilung für experimentelle Therapie und Immunitätsforschung).]

## **Experimentelle Studien zur Theorie und Praxis der Eiweißdifferenzierung.**

Von Dr. med. Fr. Graetz.

(Eingegangen bei der Redaktion am 28. Februar 1912.)

### **I. Ueber Auswertung von Antieißseris.**

Angesichts der allgemeinen Verbreitung, welche die mehr oder minder modifizierte Bordet-Gengousche Versuchsanordnung als diagnostische Methode, sei es als Wassermannsche Reaktion zur Feststellung syphilitischer Reaktionskörper, sei es in irgendwie veränderter Form zur Diagnose verschiedener Infektionskrankheiten gefunden hat, muß es in gewisser Hinsicht befremden, daß sich das von Neisser und Sachs für die Eiweißdifferenzierung ausgearbeitete, bekanntlich ebenfalls auf der Komplementbindung beruhende Verfahren, in praktischer Hinsicht, d. h. namentlich für die Antigendiagnose in Foro (Blutnachweis; Nachweis von Verfälschungen in Nahrungsmitteln) einen autorisierten Platz nicht zu erringen vermochte. Es ist dies um so auffälliger, als die Brauchbarkeit des genannten Eiweißdifferenzierungsverfahrens, wie auf Grund zahlreicher wissenschaftlicher Arbeiten feststeht, heute wohl über jeden Zweifel erhaben ist, und das Verfahren außerdem wohl auch insofern eine amtliche Anerkennung beanspruchen könnte, als gerade die genannte Methode es war, welche der praktischen Verwertung des Komplementbindungsverfahrens, das sich doch bereits auf den verschiedensten Gebieten glänzend bewährt hat, überhaupt erst die Wege geebnet hat.

Es ist allerdings unbestreitbar, daß wir in der Präzipitationsmethode, wie sie durch die klassischen Arbeiten von Uhlenhuth und seiner Schule für die forensische Praxis festgelegt ist, ein durchaus souveränes Eiweißdifferenzierungs-

verfahren besitzen, welches sich in zahlreichen Fällen als hervorragendes diagnostisches Hilfsmittel erwiesen hat und außerdem den Vorzug einer relativ einfachen technischen Handhabung besitzt. Für die Beurteilung der Versuchsergebnisse liegen die Verhältnisse jedoch keineswegs immer so einfach, und wohl jeder, der sich nach irgendeiner Richtung regelmäßig mit der forensischen Eiweißdifferenzierung zu befassen hat, wird die Erfahrung machen müssen, daß wir in manchen Fällen, in denen es sich namentlich um den Nachweis ganz geringer Spuren einer Eiweißart handelt, bei der Abgabe des Urteils zu einem „non liquet“ verdammt sind. Gerade bei meinen ausgedehnten Untersuchungen an gekochten Würsten, bei denen es infolge der starken Denaturierung vielfach kaum eben noch gelingt, Spuren nativer reaktionsfähiger Eiweißkörper in Lösung zu bringen, welche bei der Anstellung der Präzipitinreaktion ein über jeden Zweifel erhabenes Resultat ergeben und die Abgabe eines nach jeder Richtung hin einwandfreien Urteils ermöglichen, habe ich es vielfach als ein dringendes Bedürfnis empfunden, noch eine weitere Methode zur Verfügung zu haben, welche zur Bestimmung der Herkunft der fraglichen Eiweißart und zur Ergänzung der Präzipitinmethode herangezogen und amtlich für die Abgabe eines gerichtlichen Gutachtens zugrunde gelegt werden könnte. In Fällen, wie in den eben skizzierten, wo es sich um den Nachweis so geringer Spuren der fraglichen Eiweißart handelt, tritt bekanntlich, wie dies von Uhlenhuth selbst betont wird, die Präzipitation meist in Form feiner hauchförmiger Trübungen und außerdem, entsprechend dem geringen Eiweißgehalt der zu prüfenden Lösungen, erst nach längerer Zeit auf. Die Beurteilung solcher feiner Trübungen, welche selbst dem Geübten zuweilen nur mit Schwierigkeit die Abgabe eines sicheren Urteils ermöglichen, ist zweifellos eine Aufgabe, die einestheils die größte Vorsicht erheischt und außerdem bei der Tragweite eines positiven Resultates bei dem Untersucher vielfach nur zu leicht das Gefühl einer gewissen Unsicherheit in der Beurteilung einer solchen erst nach längerer Zeit auftretenden Trübung erweckt, zumal ja den in stark verdünnten Eiweißlösungen naturgemäß sehr spät auftretenden Trübungen nur



eine bedingte Geltung für die Praxis beigelegt werden darf, da ja eben die Präzipitationsmethode bei einer längeren Beobachtungsdauer ihres spezifischen Gepräges verlustig geht.

Für solche Fälle besitzen wir in dem wissenschaftlich und praktisch als durchaus gleichwertig mit der Präzipitation erkannten, für die forensische Praxis aber bis jetzt leider noch nicht anerkannten Verfahren der Komplementbindung nach Neisser und Sachs eine Methode, welche geeignet erscheint, gegebenen Falles einem fühlbaren Mangel der Präzipitatinmethode abzuhelpen. Eine Reihe angeblicher Nachteile, die dem Komplementbindungsverfahren zum Vorwurf gemacht werden — welche bei sachgemäßer Ausführung der Reaktion jedoch niemals die ihnen von der Uhlenhuthschen Schule beigelegte Bedeutung erlangen können — nicht zum wenigsten aber wohl die Autorität der Uhlenhuthschen Schule, welche einem Festhalten an dem alten bewährten Verfahren, für dessen Ergänzung und Verdrängung ein zwingendes Bedürfnis anscheinend nicht vorlag, nachdrücklich das Wort redete, hat bislang eine Gleichstellung der beiden Methoden für die forensische Praxis verhindert<sup>1)</sup>.

Es muß mit Neisser und Sachs ohne weiteres zugegeben werden, daß die Technik des Komplementbindungsverfahrens eine wesentlich kompliziertere ist als die der Präzipitatinmethode. Auf zahlreiche eigene Experimente gestützt, möchte ich jedoch in voller Uebereinstimmung mit Neisser und Sachs betonen, daß die Ausführung der Komplementbindungsmethode sich praktisch keineswegs so kompliziert gestaltet, wie es auf Grund der einschlägigen Vorschriften den Anschein haben könnte, und daß der etwas zeitraubenderen und komplizierteren Technik vor allem ein erheblicher Vorteil gegenüber steht, nämlich der wesentlich sinnfälligere Ausfall

---

1) Im Hinblick auf die oben geschilderten Schwierigkeiten haben wir es im Institut auf spezielle Veranlassung Dunbars seit langer Zeit zum Prinzip erhoben, bei unseren forensischen Eiweißdifferenzierungsversuchen die mit der Uhlenhuthschen Methode gewonnenen Versuchsergebnisse vermittels des Komplementbindungsverfahrens zu kontrollieren. Wir geben die zu einer Beanstandung führende Diagnose „positiv“ regelmäßig nur dann ab, wenn wir einen übereinstimmenden Ausfall bei beiden Methoden beobachten.

der Reaktion und die hierdurch ermöglichte zweifellos leichtere Beurteilung der Versuchsergebnisse. Wird außerdem, wie dies zweckmäßigerweise für die Komplementbindungsreaktion ebenso wie für die Präzipitinreaktion gefordert werden muß, die Reaktion in Laboratorien vorgenommen, welche sich speziell mit der Ausführung der Immunitätsreaktionen befassen und deren Leiter mit dem Arbeitsgebiete vollkommen vertraut sind, so kann der Einwand einer zu komplizierten Technik praktisch kaum in Frage kommen.

Bezüglich der Spezifität der Komplementbindungsreaktion bestehen nach dem heutigen Stande unserer Kenntnisse, soweit es sich wenigstens um das Eiweißdifferenzierungsverfahren handelt, keine prinzipiellen Differenzen gegenüber den mit der Präzipitinmethode gewonnenen Ergebnissen, und auch sonst sind gegen das Komplementbindungsverfahren wohl keinerlei Bedenken zu erheben, wenn man nicht gerade in dem größeren Geltungsbereich und in der größeren Feinheit der Methode einen Nachteil erblicken will. Die Vertrautheit des Untersuchers mit dem Arbeitsgebiete vorausgesetzt, wird bei Anwendung der erforderlichen Kontrollen eine Fehldiagnose mit Hilfe des Komplementbindungsverfahrens ebenso häufig bzw. ebenso selten zu befürchten sein, wie mit der Präzipitinmethode.

Außer in dem schon erwähnten sinnfälligeren Ausfall der Reaktion und der dadurch bedingten leichteren Beurteilungsmöglichkeit der Versuchsergebnisse liegt meines Erachtens ein ganz wesentlicher Vorteil der Methode in ihrer größeren Feinheit und in dem weiteren Geltungsbereiche der Reaktion. Es ist heute durch zahlreiche wissenschaftliche Arbeiten, unter denen ich unter anderen besonders die Arbeiten von J. Bauer, Rickmann und Bruck hervorheben möchte, unzweideutig erwiesen, daß die Komplementbindungsmethode als die entschieden feinere Eiweißdifferenzierungsmethode gelten muß, wenn auch in den meisten Fällen die beiden Reaktionen parallel gehen und wo eine Präzipitation auftritt, meist auch eine Komplementbindung zu verzeichnen ist. Daneben fehlt es aber auch nicht an Fällen, wo dank der größeren Feinheit des Ablenkungsverfahrens eine Komplementablenkung auch dort festzustellen ist, wo eine sichtbare Präzipitation noch

nicht oder nicht mehr nachweisbar ist. Gerade in dieser Erfahrungstatsache, daß der Geltungsbereich der Komplementbindungsreaktion als der größere gelten muß, indem die zur Eiweißdifferenzierung verwendeten Antisera im Komplementbindungsversuch meist dort noch zum Nachweis einer fraglichen Eiweißart ausreichen, wo ihre Verwendung im Präzipitationsverfahren unmöglich oder doch unsicher wird, liegt meines Erachtens ein weiterer nicht zu unterschätzender Vorteil der Komplementbindungsmethode. Ausgehend von den praktisch in Frage kommenden Verhältnissen verlangt das Uhlenhuthsche Verfahren, daß die zur Präzipitation verwendeten Antisera einen Nachweis der homologen Eiweißart noch in einer Verdünnung von 1 : 10 000 bzw. 1 : 20 000 ermöglichen. Nach den eigenen Angaben Uhlenhuths kann ein derartig hoher Titer günstigen Falles bei 10 Proz. der Versuchstiere erreicht werden, ja bei Verwendung mancher Eiweißarten kann sogar nur eine noch geringere Ausbeute an brauchbaren Immunseren erzielt werden. Demgegenüber gilt als allgemein feststehende Tatsache in der Literatur, daß zum Nachweis selbst starker Verdünnungen einer Eiweißart mittels des Komplementbindungsversuches Antisera von nur mittlerem oder selbst relativ niedrigem Präzipitationstiter benötigt werden, da diese Sera durchweg einen höheren Komplementbindungstiter aufweisen. Namentlich dann, wenn es sich darum handelt, feinere biologische Unterschiede zwischen den Eiweißarten verwandter Tierspecies oder zwischen den Körperflüssigkeiten ein und derselben Tierart festzustellen, können derartige Sera mit geringerem Präzipitationstiter oftmals mit besonderem Vorteil für die Eiweißdifferenzierung im Komplementbindungsverfahren verwendet werden. So hat z. B. Bruck seinerzeit auf Grund seiner Untersuchungen über die verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen Menschen und Affen darauf hingewiesen, daß man sich für derartige Differenzierungsversuche mit Vorteil solcher Immunsera mit niedrigem Präzipitationstiter bedienen könne. An der Hand eigener Versuche habe ich selbst, sowohl bei meinen Untersuchungen über die biologischen Beziehungen zwischen Mäusen und verschiedenen Rattenarten, wie bei meinen Studien über die gegenseitigen Beziehungen zwischen Milch, Colostrum und

Blutserum des Rindes, ebenfalls die Zweckmäßigkeit der Verwendung derartiger Immunsera betont.

Die praktische Verwendbarkeit von Immunseris der eben geschilderten Art hat naturgemäß eine ausreichende komplementbindende Fähigkeit derselben gegenüber dem homologen Antigen zur Voraussetzung, welche unter allen Umständen das Antigen in den erforderlichen Verdünnungen mittelst der Komplementbindungsmethode nachzuweisen erlaubt. Die Betonung dieser Voraussetzung hätte vielleicht vor kurzer Zeit noch als überflüssig gelten können, da in den einschlägigen Mitteilungen der Literatur die eingangs schon einmal erwähnte Auffassung vorherrschte, „daß die Komplementbindungsmethode gegenüber der Präzipitation die weitgehenderen Ausschläge gäbe, daß ihr Bereich der größere sei und entsprechend demnach auch da, wo eine Präzipitation stattfindet, eine Komplementbindung eintritt“. Durch die von Haendel und Steffenhagen mitgeteilten gegenteiligen Befunde, wonach selbst ein hoher Präzipitationstiter bei Antieißseris keineswegs unter allen Umständen ein entsprechendes, oder gar ein höheres Komplementbindungsvermögen voraussetzt, hat die allgemein gültige Anschauung vom Parallelismus der beiden Eiweißdifferenzierungsmethoden einen gewaltigen Stoß erlitten und bedarf angesichts der praktischen Wichtigkeit dieser Beobachtungen eine entschiedene Rektifizierung, wenn anders es sich bei den Beobachtungen von Haendel und Steffenhagen, die bislang in der Literatur von anderer Seite noch nicht gemacht wurden, nicht um eine vereinzelte oder seltene Erscheinung gehandelt hat.

Haendel und Steffenhagen haben bekanntlich gelegentlich vergleichender Untersuchungen „Ueber den Nachweis intravenös zugeführten artfremden Eiweißes in der Blutbahn des Kaninchens“ die auffallende und den bis dahin praktisch gemachten Erfahrungen widersprechende Beobachtung gemacht, daß 3 hochwertige Pferdeantisera, welche, nach Uhlenhuth ausgewertet, einen Präzipitationstiter von 1:20 000 aufwiesen, eine so auffallend geringe komplementbindende Kraft entfalteten, daß in dem speziellen Falle der Nachweis der in Frage kommenden Eiweißart mittelst des Komplementbindungsverfahrens nicht durchgeführt werden konnte. Wie

die genannten Autoren mit Recht betonen, hätte die Tatsache an sich, daß gelegentlich die mit den beiden Eiweißdifferenzierungsmethoden erhaltenen Resultate weitgehend, oder sogar vollkommen differieren, nichts besonders Auffallendes gehabt, da ja allgemein bekannt ist, und besonders von Sachs in seinen Monographien mehrfach darauf hingewiesen wurde, daß die biologischen Grundlagen der beiden Eiweißdifferenzierungsmethoden voneinander wesentlich verschieden sind, wenn die genannten Beobachtungen eben nicht im krassen Widerspruch zu den praktisch gemachten Erfahrungen stünden.

Worauf es beruht, daß derartige Beobachtungen von prinzipieller Bedeutung sich bislang unserer Kenntnis entzogen haben, wird schwer zu sagen sein. Ganz so vereinzelt, wie man auf Grund der in der Literatur gemachten Feststellungen annehmen könnte, sind derartige Erscheinungen offenbar doch nicht<sup>1)</sup>. Angesichts der Erhebungen, welche Haendel und Steffenhagen in dieser Hinsicht bei ihren systematischen Auswertungsversuchen von 17 Antieiweißseris machen konnten, wird die Annahme wohl nicht von der Hand zu weisen sein, daß diesen Befunden von seiten der Autoren bislang nur eine gebührende Beachtung nicht geschenkt wurde, da ja wohl die von autoritativer Seite stets betonte Auffassung eines Parallelismus im Ausfall der Präzipitations- und Komplementbindungsmethode von den meisten Autoren mangels gegenteiliger praktischer Erfahrung ziemlich voraussetzungslos übernommen wurde.

Soweit ich die einschlägige Literatur vor dem Erscheinen der Arbeit von Haendel und Steffenhagen zu übersehen vermag, finden sich dort außer den Feststellungen der genannten Autoren nur in den zahlreichen Arbeiten von J. Bauer, welche sich mit der Differenzierung der Milcheiweißkörper befassen, einige Befunde, welche gegebenenfalls mit den Beobachtungen von Haendel und Steffenhagen in eine gewisse Parallele zu setzen sind. Bauer hatte bekanntlich die merkwürdige Tatsache festgestellt, daß ein gegen

---

1) Nach mündlicher Mitteilung von Herrn Dr. Gaehtgens sind am Hygienischen Institut zu Straßburg ähnliche Beobachtungen gemacht, leider aber in der Literatur nicht mitgeteilt worden!

Milcheiweiß gerichtetes Antiserum, welches das homologe Antigen noch in einer Verdünnung von 1:100 000 ablenkte und auch mit dem Blutserum der gleichen Tierart im Präzipitationsversuch in Reaktion trat, im Komplementbindungsversuch keinerlei Reaktion gegenüber dem Blutserum aufwies. Es lag somit auch hier ein „Versager“ der besonders von Bauer stets als feiner gerühmten Komplementbindungsreaktion gegenüber der Präzipitation vor. Die Verhältnisse liegen allerdings bei Bauer insofern etwas anders als in den Versuchen von Haendel und Steffenhagen, da dieses Versagen nicht gegenüber dem homologen, sondern gegenüber einem verwandten Antigen in Erscheinung trat, mit dem das fragliche Immunserum im Präzipitationsversuch jedoch unzweideutig, wenn auch nur in den stärkeren Konzentrationen, in Reaktion getreten war.

Vor einiger Zeit habe ich selbst in einer Arbeit, die sich mit der Nachprüfung der Bauerschen Milcheiweißdifferenzierungsversuche befaßt, auf eine analoge Beobachtung, wie die von Bauer bzw. von Haendel und Steffenhagen hingewiesen. Auch bei meiner Beobachtung, die im übrigen die einzige dieser Art unter zahlreichen bis dahin vorgenommenen Auswertungsversuchen darstellte, handelte es sich um ein Antiserum gegen die Fröhmilch des Rindes (Colostrum), welches mit dem Antigen der Vorbehandlung im Komplementbindungsversuch bis zu einer Verdünnung von 1:50 000 in Reaktion trat und gegen das Serum der gleichen Tierspecies, trotz einer Präzipitation von fast gleicher Stärke wie gegen das homologe Antigen, auch in den stärkeren Konzentrationen beim Komplementbindungsversuch in keiner Weise reagierte. Ich habe es damals offen gelassen, ob es sich in diesen Fällen entsprechend der Auffassung Bauers um ein Prävalieren eines Hauptantikörpers auf Kosten der Partialantikörper handelt, oder ob ähnliche in ihrem Wesen ja allerdings ebenfalls noch ungeklärte Verhältnisse vorliegen, wie bei den Beobachtungen von Haendel und Steffenhagen. Im übrigen habe ich schon gelegentlich der Besprechung dieser Beobachtung die Vermutung ausgesprochen, daß es sich hierbei um eine in weiten Grenzen von der Individualität des jeweils zur Immunisierung verwendeten Ver-

suchstieres abhängige Erscheinung handeln könne, und bin auf Grund meiner weiteren Untersuchungen in dieser Auffassung nur noch bestärkt worden. Jedenfalls gaben aber diese Beobachtungen für mich den äußeren Anstoß, bei den Auswertungen von Antieiweißseris den von Haendel und Steffenhagen geschilderten Verhältnissen eine besondere Beachtung zu schenken.

Bevor ich auf die Besprechung meiner Versuchsergebnisse näher eingehe, möchte ich es nicht unterlassen, nochmals kurz die von mir geübte Technik zu skizzieren. Die Technik des Komplementbindungsverfahrens für die Eiweißdifferenzierung nach Neisser und Sachs ist allerdings in den verschiedensten einschlägigen Abhandlungen so häufig, teils mehr, teils weniger ausführlich wiedergegeben worden, daß es wohl als überflüssig erscheinen könnte, hierauf erneut einzugehen, wenn nicht eben die praktische Erfahrung lehrte, wie gerade kleine, scheinbar unwesentliche Abweichungen in der Versuchstechnik unter Umständen zu direkt entgegengesetzten Endresultaten führen können.

Als hämolytisches System diene mir bei sämtlichen Versuchen ein immunisatorisch gewonnener Ambozeptor gegen Hammelblut, gewaschene Hammelblutkörperchen in 5-proz. Aufschwemmung, sowie eine 10-proz. Lösung frischen Meerschweinchenserums als Komplement. Neisser und Sachs haben seinerzeit den Vorschlag gemacht, in Fällen, in denen es sich um den Nachweis von Rinder- oder Hammeleiweiß handelte, zur Erzielung reiner Versuchsbedingungen ein gegen Schweineblutkörperchen gerichtetes hämolytisches System zu verwenden. Ich habe bei meinen zahlreichen Versuchen eine störende Einwirkung des allgemein gebräuchlichen hämolytischen Systems auch in Fällen der von Neisser und Sachs genannten Art nicht beobachten können und deshalb aus praktischen Gründen von der Anwendung eines zweiten hämolytischen Systems Abstand genommen. Die Einstellung des hämolytischen Systems wurde im Hinblick auf die allgemein bekannten Schwankungen in der Wirksamkeit der verschiedenen Meerschweinchensera selbstverständlich für jeden Versuch erneut vorgenommen. Für die Einstellung des hämolytischen Systems habe ich mich durchweg an die von

Neisser und Sachs ursprünglich in ihrer klassischen Monographie gegebene Vorschrift gehalten und im Gegensatz zu Haendel und Steffenhagen sowie zu den meisten Autoren, welche jedesmal eine Titration des Ambozeptors gegenüber der an sich willkürlich gewählten Komplementmenge von 0,1 ccm ausführen, entsprechend der Originalvorschrift die Einstellung für ein bestimmtes Ambozeptorserum nur einmal vorgenommen, wobei als Komplementeinheit ebenfalls 0,1 ccm zugrunde gelegt wurde. Die Einstellung des Ambozeptorserums erfolgt hierbei in der Weise, daß fallende Mengen des inaktivierten Ambozeptorserums gegenüber der genannten Komplementeinheit bis zur Feststellung der minimal lösenden Dosis ausstitriert werden. Der bei diesem Einstellungsversuch gewonnene Ambozeptorwert wird nach Angabe von Neisser und Sachs verdoppelt und dient dann während der ganzen Verwendungsdauer des Ambozeptorserums, d. h. auf Monate hinaus, als unveränderliche Standardddosis, gegen die im Einzelfalle das Komplementserum ausgewertet wird. Die Bestimmung der kleinsten lösenden Komplementmenge erfolgt nach den gleichen Prinzipien gegenüber dieser Standardddosis des Ambozeptors. Zum eigentlichen Komplementbindungsversuch gelangt regelmäßig das 2- bis  $2\frac{1}{2}$ -fache Multiplum der kleinsten komplett lösenden Komplementmenge zur Anwendung. Diese Art der Versuchsanordnung hat sich mir in zahlreichen Experimenten auf das beste bewährt. Die Anwendung einer konstanten Ambozeptordosis hat den Vorteil, daß wir stets wenigstens annähernd gleich stark sensibilisierte Blutkörperchen erhalten, daß wir also die auch von Haendel und Steffenhagen nicht für empfehlenswert gehaltene Hyper sensibilisierung der Blutkörperchen nach Möglichkeit vermeiden. Nach meinen Erfahrungen machen sich bei dieser Art der Einstellung auch die Schwankungen im Komplementgehalt der einzelnen Meerschweinchensera nicht in so erheblichem Maße geltend, wie dies allgemein in der Literatur angegeben wird. Von einigen Ausnahmen abgesehen konnte ich bei dieser Art der Versuchsanordnung sogar eine ziemliche Konstanz der verschiedenen Komplemente hinsichtlich ihrer hämolytischen Aktivität beobachten. Auch hinsichtlich der Ablenkungsmöglichkeit der einzelnen Komplemente scheint mir



die Versuchsanordnung von Neisser und Sachs nicht zu unterschätzende Vorteile zu bieten, welche in der geringeren zur Verwendung kommenden Komplementmenge liegen. Ich bin in meinen zahlreichen hämolytischen Versuchen fast nie zu einer höheren Komplementmenge als 0,5 ccm des 10-proz. Serums gekommen, da sich mir in der Regel 0,2 ccm des 10-proz. Komplementes als ausreichend erwiesen, um mit der im Vorversuch ermittelten Standarddosis des Ambozeptors innerhalb der Zeiteinheit von 30 Minuten eine vollständige Hämolyse der üblichen Menge von 1 ccm einer 5-proz. Blutkörperchenaufschwemmung herbeizuführen. Die Verwendung des 2—2 $\frac{1}{2}$ -fachen Multiplums dieser Komplementmenge, d. h. also 0,5 ccm der 10-proz. Lösung für den Hauptversuch vermochte dann in der Regel eine, auch für die Ausscheidung eventueller antikomplementärer Eigenschaften mancher Reagentien, ausreichende Schärfe des hämolytischen Systems zu garantieren, ohne gleichzeitig durch allzugroßen Komplementüberschuß die Feinheit der Reaktion zu stören. Die Anwendung einer so geringen Komplementmenge wird sich, selbst wenn man von der wirtschaftlichen Seite ganz absehen will, besonders dann mit Vorteil geltend machen, wenn uns bei der Einstellung eines Antiserums ein schlecht deviables Komplement zur Verfügung steht, oder wenn es sich um ein relativ schwach ablenkendes Serum handelt. Daß die Einstellung des Komplements gegenüber einer einmal festgelegten Ambozeptordosis auch in technischer Hinsicht den Vorteil einer Zeitersparnis mit sich bringt, sei nur nebenbei erwähnt. Bezüglich der Technik der hämolytischen Versuche sei noch darauf hingewiesen, daß dieselben wie bei meinen früheren Untersuchungen durchweg in einem Gesamtvolumen von 5 ccm vorgenommen wurden, gegenüber der ursprünglichen Vorschrift von Neisser und Sachs, dieselben in einem Gesamtvolumen von 2,5 ccm auszuführen.

Der Vorversuch gestaltet sich also bei dem geschilderten Modus der Versuchsanordnung denkbar einfach und beschränkt sich auf die Feststellung der minimal lösenden Komplementmenge, deren 2—2 $\frac{1}{2}$ -faches Multiplum zum Hauptversuch verwendet wird. Ich lasse hier das Serum eines solchen Vorversuches folgen.

Tabelle I.

Antigen	Anti- serum	Komplement 10-proz. Lös.	Hammelblut 5-proz. Lös.	Ambozeptor 0,5-proz. Lös.	Ergebnis nach 30 Min.
1,0 NaCl dgl.	1,0 NaCl dgl.	0,5 ccm	1,0 ccm	0,2 ccm	θ
"	"	0,4 "	dgl.	dgl.	θ
"	"	0,3 "	"	"	θ
"	"	0,2 "	"	"	θ
"	"	0,1 "	"	"	++θ

θ = komplette Hämolyse. ++θ = Spur Hämolyse.

Die minimallösende Dosis würde für den angezogenen Fall 0,2 der 10-proz. Komplementlösung betragen, ein Wert, wie ich ihn bei meinen zahlreichen Komplementbindungsversuchen mit der von mir geübten Versuchstechnik von wenigen Ausnahmen abgesehen fast regelmäßig für alle Meerschweinchenkomplemente gefunden habe. Wie schon erwähnt, würde für den vorliegenden Fall das  $2\frac{1}{2}$ -fache Multiplum des gefundenen Minimalwertes, d. h. 0,5 ccm im Hauptversuch zur Verwendung gelangen.

An diese Wertbestimmung des Komplementes schließt dann unmittelbar der eigentliche Auswertungsversuch des zur Prüfung bestimmten Antiserums an. Für die Prüfung des Antiserums im Komplementbindungsversuch habe ich mich im Prinzip an die Vorschriften von Neisser und Sachs gehalten. In der Regel geht dabei eine Auswertung des Antiserums mit Hilfe der Präzipitationsmethode nach Uhlenhuth dem Komplementbindungsversuch voran. Es erscheint mir zweckmäßig, bevor ich auf die theoretische Erörterung der Versuchsanordnung eingehe, die in der Praxis geübte Technik zunächst an einem Auswertungsversuch tabellarisch zu illustrieren. Ich greife aus meinen zahlreichen einschlägigen Versuchen die Auswertung eines beliebigen Serums heraus.

Kaninchen 414, immunisiert mit Rinderserum.

Tabelle II a (Präzipitationsversuch.)

0,1 ccm unverdünntes Antiserum 414 (Rinderantiserum) präzipitiert:

Verdünnung des Antigens	Rinderserum		Verdünnung des Antigens	Rinderserum	
	n. 5 Min.	n. 20 Min.		n. 5 Min.	n. 20 Min.
1:50	++	++	1:2000	+±	++
1:100	++	++	1:5000	+	+±
1:500	++	++	1:10000	±	+
1:1000	+±	++	1:20000	Spur	±

Tabelle II b (Komplementbindungsversuch).

Antigen (Rinder- serum)	Anti- serum (1 : 10)	Komplement 10-proz.	Hammel- blut 5-proz.	Ambozeptor (Hämolyisin)	Ergebnis	
					a) aktiv	b) inaktiv
0,0001	1,0	0,5	1,0	0,002	+++	+++
0,0001	0,8	0,5	1,0	0,002	+++	+++
0,0001	0,6	0,5	1,0	0,002	+++	+++
0,0001	0,5	0,5	1,0	0,002	+++	+++
0,0001	0,4	0,5	1,0	0,002	+++	+++
0,0001	0,3	0,5	1,0	0,002	+++	+++
0,0001	0,2	0,5	1,0	0,002	+++	+++
0,0001	0,1	0,5	1,0	0,002	θ	θ
1,0 NaCl	1,0	0,5	1,0	0,002	θ	θ
0,0001	1,0 NaCl	0,5	1,0	0,002	θ	Kontrolle

Die Auswertung des Antiserums gestaltet sich also analog der tabellarischen Aufzeichnung derart, daß fallende Mengen des Antiserums gegenüber einer gleichbleibenden Antigenmenge bei konstantem hämolytischen System auf Bindungsfähigkeit geprüft werden. Entsprechend der auch für die Präzipitationsmethode aufgestellten Forderung, daß das zur Anwendung kommende Antiserum den Nachweis einer fraglichen Eiweißart zum mindesten noch in einer Verdünnung von 1:10000 ermöglichen muß, habe ich laut Vorschrift von Neisser und Sachs durchweg die Menge von 0,0001 ccm der homologen Eiweißart als Testdosis für die Wertigkeit des Serums im Komplementbindungsversuch zugrunde gelegt. Die abgestuften Mengen des Antiserums bewegten sich zwischen 0,1 und 0,01 ccm. Von der Verwendung höherer Serumdosen (etwa 0,2 ccm), wie sie Haendel und Steffenhagen in ihren Versuchen zur Anwendung gebracht haben, habe ich Abstand genommen, da ich auch bei diesen Versuchen in Uebereinstimmung mit Neisser und Sachs wiederum die von mir auch an anderer Stelle schon betonte Tatsache feststellen konnte, daß höhere Serumdosen vielfach ein geringeres Komplementbindungsvermögen entfalten, als die mittleren oder niedrigen Dosen des entsprechenden Serums. Außerdem konnte ich nicht allzu selten die Beobachtung machen, daß diese höheren Serummengen wegen ihrer ausgesprochenen antikomplementären Eigenschaften überhaupt nicht zur Verwendung gelangen konnten. Besonders das frische Kaninchen-

immunserum entfaltet diese antikomplementäre Wirkung vielfach in ziemlich beträchtlicher Stärke. Es ist dies ein Umstand, der sich indessen durch halbstündiges Erhitzen des Antiserums auf  $56^{\circ}$  so gut wie regelmäßig beseitigen läßt, ohne daß das erhitzte Serum, von vereinzelt Fällen abgesehen, eine merkliche Herabminderung seiner komplementbindenden Fähigkeiten erfährt, und der mich auch veranlaßte, für meine Komplementbindungsversuche zum Zweck der Eiweißdifferenzierung gewöhnlich das inaktivierte Immunserum zu verwenden. Bei dem absoluten Parallelismus, den ich bei meinen zahlreichen vergleichenden Prüfungen in der Wirksamkeit des aktiven und inaktivierten Immunserums feststellen konnte, schien mir die Maßregel der Inaktivierung um so zweckdienlicher und gerechtfertigter, als sie ja für eine weitere vorteilhafte Behandlung schwachbindender Immunsere, auf deren Wert ich später noch zurückkommen werde, nämlich für die Entfernung der oftmals sehr störend wirkenden Normalambozeptoren des Kaninchenserums, die *conditio sine qua non* darstellt. Aus rein technischen Gesichtspunkten wird das Immunserum nach erfolgter Inaktivierung mit NaCl auf eine Verdünnung von 1:10 gebracht, um beim Abmessen so kleiner Quantitäten wie etwa 0,01 ccm, die Fehlerquellen, welche durch das Haften von Flüssigkeit in den graduierten Kapillarpipetten entstehen können, nach Möglichkeit zu verringern.

Wie aus der tabellarischen Zusammenstellung ersichtlich ist, werden also fallende Mengen des Eiweißantiserums (im vorliegenden Falle ein Antiserum gegen Rindereiweiß) mit 0,0001 ccm des Antigens (R.S.) und 0,5 ccm Komplement (10-proz. Meerschweinchenserum) gemischt und dann im Thermostaten  $\frac{1}{2}$  Stunde bei  $37^{\circ}$  zur Bindung belassen. Nach Ablauf dieser Zeit wird das hämolytische System zugesetzt, d. h. 1 ccm Hammelblut und 0,002 ccm hämolytischer Ambozeptor. — Die Menge des hämolytischen Ambozeptors wechselt naturgemäß mit der Stärke des einzelnen hämolytischen Immunserums. — Nach Ablauf einer weiteren Stunde erfolgt dann die Ablesung des Versuchs. Zum Verständnis der Tabelle sei hinzugefügt, daß nur die absoluten Mengen der einzelnen für die Versuchsanordnung nötigen Reagentien in die Tabelle eingetragen sind: die zur Ergänzung auf je 1 ccm benötigten

Kochsalzquantitäten sind zur Vereinfachung der Tabelle weggelassen.

Aus der Tabelle erkennen wir also, daß in unserem Falle die „absolute Ablenkungszone“ des Antiserums gegenüber der Antigenmenge von 0,0001 ccm zwischen 0,1 und 0,02 des nativen (bezw. 1,0 bis 0,2 des 10-fach verdünnten) Antiserums gelegen ist. Bei Verwendung des inaktivierten Serums liegt die minimale ablenkende Dosis zwischen 0,02 und 0,03, da hierbei 0,02 ccm zwar noch eine ausgesprochene aber keine absolute Ablenkung mehr bewirken. Wie aus den am Ende der Tabelle angeführten Kontrollversuchen ersichtlich ist, zeigt das Antiserum selbst in der größten zum Versuch verwendeten Dosis von 0,1 ccm (= 1,0 1:10) keine die Hämolyse hemmende Wirkung und auch die im Versuch verwendete Antigenmenge von 0,0001 ccm läßt jegliche antikomplementäre Eigenschaften vermissen.

Neisser und Sachs fordern in ihrer schon mehrfach zitierten Monographie neben der Prüfung auf Bindungsfähigkeit auch eine Feststellung der antikomplementären Wirkung bei sämtlichen im Versuch verwendeten fallenden Antiserumdosen. Auf Grund praktischer Erfahrungen habe ich im Laufe der Zeit von dieser Maßnahme Abstand genommen und mich in der Regel damit begnügt, die stärkste im Versuch verwendete Antiserumdosis auf antikomplementäre Wirkung zu kontrollieren, da nach meinen einschlägigen Erfahrungen ein Fehlen antikomplementärer Wirkung bei der stärksten Antiserumdosis durchweg den Schluß auf ein gleiches Verhalten der mittleren und schwächeren Serumdosen zuläßt.

Für den eigentlichen Eiweißdifferenzierungsversuch, d. h. für die Identifizierung einer fraglichen Eiweißart empfiehlt es sich nach den Angaben von Neisser und Sachs, das  $1\frac{1}{2}$ —2-fache Multiplum der im Auswertungsversuch festgestellten minimalen Antiserummenge zu verwenden, welche mit 0,0001 ccm des homologen Antigens noch eine komplette Hemmung der Hämolyse bedingt. Höhere Serumdosen zu verwenden empfiehlt sich aus zwei Gründen nicht. Wie schon oben erwähnt, zeigen höhere Serumdosen unter Umständen ein wesentlich schlechteres Bindungsvermögen und außerdem

erscheint eine zu große Steigerung der Empfindlichkeit der Reaktion nicht zweckmäßig.

Der Gang der Versuchsanordnung zum Zweck der Prüfung der Reaktionsempfindlichkeit sei in nachfolgender Tabelle illustriert. Zur Erklärung sei noch hinzugefügt, daß sowohl für das aktive wie für das inaktive Antiserum 0,4 ccm der 10-fachen Verdünnung des Antiserums zur Verwendung kamen.

Tabelle III.

Antigen (Rinder- serum)	Anti- serum 1 : 10	Kom- plement 10-proz.	Hammel- blut 5-proz.	Ambo- zeptor	Ergebnis	
					a) aktiv	b) inaktiv
0,002	0,4	0,5	1,0	0,002	+++	+++
0,001	0,4	0,5	1,0	0,002	+++	+++
0,0005	0,4	0,5	1,0	0,002	+++	+++
0,0002	0,4	0,5	1,0	0,002	+++	+++
0,0001	0,4	0,5	1,0	0,002	+++	+++
0,00005	0,4	0,5	1,0	0,002	+++	+++
0,00002	0,4	0,5	1,0	0,002	++ $\theta$	$\theta$
0,00001	0,4	0,5	1,0	0,002	$\theta$	$\theta$
1,0 NaCl	0,4	0,5	1,0	0,002	$\theta$	$\theta$
0,002 R.-Ser.	1,0 NaCl	0,5	1,0	0,002	$\theta$	$\theta$
0,001 R.-Ser.	1,0 NaCl	0,5	1,0	0,002	$\theta$	$\theta$

Erklärung der Zeichen: +++ = komplette Hemmung; ++ $\theta$  = Spur Hämolyse;  $\theta$  = komplette Hämolyse.

Die Empfindlichkeitsprüfung der Reaktion besagt uns also für diesen Fall, daß das fragliche Antigen mit Hilfe der Komplementbindungsmethode bei Verwendung einer Serummenge von 0,04 ccm des Antiserums noch in einer Verdünnung von 1 : 20000 (= 0,00005 ccm) in sinnfälliger Weise nachgewiesen werden kann. Auch bei einer Verdünnung des Antigens von 1 : 50000 ist bei Verwendung der genannten Antiserumdosis, wenigstens beim aktiven Immunserum, noch eine ausgesprochene Reaktion zu erkennen, wenngleich bei dieser Verdünnung die Reaktion nicht mehr zu einer vollständigen Hemmung der Hämolyse geführt hat. Die Empfindlichkeit der Komplementbindungsreaktion entspricht also in unserem Falle annähernd derjenigen der Präzipitationsreaktion des gleichen Antiserums, nur mit dem Unterschiede, daß bei der Komplementbindungsmethode eine wesentlich geringere Antiserummenge zur Verwendung gelangt. Die Reaktion er-

füllt somit eine von Neisser und Sachs betonte Forderung, sie ist nicht zu empfindlich und besitzt gleichzeitig den Vorteil eines wesentlich sinnfälligeren Ausfalls. Während wir bei Anwendung der Präzipitationsreaktion eine nur schwer zu beurteilende langsam auftretende Trübung als Kriterium der positiven Reaktion in den stärkeren Verdünnungen des Antigens zur Verfügung haben, die noch vielfach dazu geeignet ist, unsere Zweifel bezüglich ihrer Spezifität zu erregen, gibt uns der sinnfällige Ausfall der Komplementbindungsreaktion, wie er sich bei positiver Reaktion in der Hemmung der Hämolyse dokumentiert, einen wesentlich geeigneteren Maßstab für die Bewertung der Reaktionsfähigkeit des einzelnen Antiserums ab. Vorbedingung für eine einwandfreie Beurteilung des Resultates ist dabei naturgemäß der Grundsatz, daß ein positives Resultat nur in einer vollständigen Aufhebung der Hämolyse bzw. in dem Ungelöstbleiben des größten Teils der Blutkörperchen erblickt wird.

Was die komplementbindende Wirkung präzipitierender Antisera im Vergleich zu ihrem Präzipitationswerte anlangt, so entspricht es nach meinen Erfahrungen keineswegs der Regel, sondern gehört immerhin zu den Seltenheiten, daß ein Eiweißantiserum von so relativ hohem Präzipitationswerte, wie das als Beispiel angeführte Antiserum 414, die Wertigkeit des Präzipitationstitors im Komplementbindungsversuch gerade eben erreicht oder doch nur um wenig übertrifft. In den meisten Fällen übertrifft die komplementbindende Fähigkeit der Antisera, ganz entsprechend der in der Literatur bestehenden Annahme, die präzipitierende Fähigkeit um ein Vielfaches. In der Tat vermöchte ja auch eine so geringe Differenz der Reaktionsbreite im Komplementbindungs- bzw. Präzipitationsversuch eine so verhältnismäßig komplizierte Versuchsanordnung wie es die Komplementbindungsreaktion bis zu einem gewissen Grade doch immerhin darstellt, kaum zu rechtfertigen und man könnte mit Recht einwenden, wozu die wesentlich kompliziertere und an Fehlerquellen demgemäß eventuell reichere Methode anwenden, wenn wir auf dem alten bewährten Wege dasselbe zu erreichen vermögen.

Gerade die größere Reaktionsbreite und Feinheit der Komplementbindungsmethode sind es ja, welche der neuen

Methode den Weg ebnen sollen, da gerade diese Eigenschaften geeignet sind, ein Aequivalent für die kompliziertere Technik abzugeben. Die Befunde von Haendel und Steffenhagen scheinen in dieser Hinsicht ja allerdings nicht gerade geeignet, den Beweis für die stets betonte und gerühmte größere Feinheit der Komplementbindungsmethode als Eiweißdifferenzierungsmethode zu erbringen. Im Gegenteil! Unter 17 von den genannten Autoren im Komplementbindungsversuch ausgewerteten Eiweißantisera, welche, von einer einzigen Ausnahme abgesehen, doch durchweg die immerhin hohen Präzipitationswerte von 1:10000—1:50000 zeigten, hat keines der auch von Neisser und Sachs aufgestellten Kardinalforderung genügt, daß das fragliche Antigen mit optimalen Serummengen noch in einer Verdünnung von mindestens 1:10000 mit Sicherheit, d. h. durch das vollständige Ausbleiben der Hämolyse nachweisbar sein muß. Keines der von den Autoren untersuchten Sera hat in irgendeiner Dosis zwischen 0,2 und 0,1 mit der Antigenmenge von 0,0001 eine komplette Hemmung der Hämolyse bewirkt. Die optimalen Ausschläge schwankten in diesen Reihen nach Angabe der Autoren gegenüber der genannten Antigenmenge zwischen starker und schwacher Lysis.

Schon an anderer Stelle habe ich darauf hingewiesen, daß ich Erscheinungen, wie die von Haendel und Steffenhagen geschilderten, wohl vereinzelt beobachtet habe, daß aber die Befunde der genannten Autoren, namentlich was Häufigkeit anlangt, im allgemeinen doch in erheblichem Gegensatz zu meinen eigenen Feststellungen stehen. Man sollte nach den Befunden von Haendel und Steffenhagen fast annehmen, daß ein hohes Komplementbindungsvermögen bei Seren von hohem Präzipitationswerte geradezu als eine Ausnahme gelten müßte, während eine erhebliche Differenz in diesen beiden Potenzen des Serums gewissermaßen als die Regel zu gelten hätte. Haendel und Steffenhagen glauben sich auf Grund ihrer Versuchsergebnisse ja auch zu dem Schluß berechtigt, daß es sich bei der von ihnen erwähnten Beobachtung, wonach empfindliche präzipitierende Sera nur geringe komplementbindende Wirkung entfalten können, nicht etwa um eine vereinzelt oder seltene Erscheinung ge-



handelt hat, sondern daß solche Sera anscheinend sogar verhältnismäßig häufig vorkommen. Daß auch Antisera vorkommen, welche im Vergleich zu ihrer präzipitierenden Wirkung ein stärkeres komplementbindendes Vermögen entfalten können, wenn diese Eigenschaften vielleicht auch nicht bei jedem präzipitierenden Antiserum ohne weiteres vorausgesetzt werden darf, das wird ja auch von Haendel und Steffenhagen zugegeben.

Schon weiter oben habe ich ausgeführt, daß die Erscheinung, wonach die komplementbindende Wertigkeit eines Antiserums eben der präzipitierenden Valenz entspricht oder sie doch nur um wenig übertrifft, wesentlich seltener zur Beobachtung kommt, als der umgekehrte Vorgang, daß ein Antiserum von mäßiger Präzipitationsstärke eine um das 10- bis 50-fache stärkere komplementbindende Wirkung entfaltet. Ein besonders eklatantes Beispiel der letzteren Art sei im nachfolgenden Versuch illustriert.

Tabelle IV a. Präzipitationsversuch.

0,1 ccm unverdünntes Antiserum 365, präzipitiert.

Verdünnung des Antigens	Eigelb vom Huhn		Verdünnung des Antigens	Eigelb vom Huhn	
	nach 5 Min.	nach 20 Min.		nach 5 Min.	nach 20 Min.
1:100	++±	+++	1:4000	+±	++
1:500	++±	+++	1:5000	+	++
1:1000	++	++±	1:10000	Spur	±
1:2000	++	++	1:20000	0	0

Tabelle IV b. Komplementbindungsversuch.

Antigen, Eigelb vom Huhn	Anti- serum 1:10	Kom- plement 10-proz.	Hammel- blut 5-proz.	Ambo- zeptor	Ergebnis	
					a) aktiv	b) inaktiv
0,0001	1,0	0,5	1,0	0,002	+++	+++
0,0001	0,8	0,5	1,0	0,002	+++	+++
0,0001	0,6	0,5	1,0	0,002	+++	+++
0,0001	0,5	0,5	1,0	0,002	+++	+++
0,0001	0,4	0,5	1,0	0,002	+++	+++
0,0001	0,3	0,5	1,0	0,002	+++	+++
0,0001	0,2	0,5	1,0	0,002	+++	+++
0,0001	0,1	0,5	1,0	0,002	++θ	++θ
1,0 NaCl	1,0	0,5	1,0	0,002	θ	θ
1,0 NaCl	0,5	0,5	1,0	0,002	θ	θ
0,0001	1,0 NaCl	0,5	1,0	0,002	θ	θ

Die Auswertung ergibt nach vorstehender Tabelle als minimale noch vollständig hemmende Antiserumdosis für aktives und inaktives Serum die Dosis von 0,02. Die nächst niedrige Dosis bewirkt gegenüber der Antigenmenge von 0,0001 nur noch eine mehr oder minder starke partielle Hemmung der Hämolyse. Verwenden wir, ausgehend von dem Grundsatz, daß die doppelte, minimal hemmende Dosis für die Wertigkeitsbestimmung Anwendung finden soll, für die Empfindlichkeitsprüfung der Reaktion 0,04 des frischen bzw. inaktivierten Serums, so ergibt sich nachfolgendes Resultat.

Tabelle IV c.

Antigen, Eigelb	Anti- serum 1 : 10	Kom- plement 10-proz.	Hammel- blut 5-proz.	Ambo- zeptor	Ergebnis	
					a) aktiv	b) inaktiv
0,002	0,4	0,5	1,0	0,002	+++	+++
0,001	0,4	0,5	1,0	0,002	+++	+++
0,0005	0,4	0,5	1,0	0,002	+++	+++
0,0002	0,4	0,5	1,0	0,002	+++	+++
0,0001	0,4	0,5	1,0	0,002	+++	+++
0,00005	0,4	0,5	1,0	0,002	+++	+++
0,00002	0,4	0,5	1,0	0,002	+++	+++
0,00001	0,4	0,5	1,0	0,002	+++	+++
0,000005	0,4	0,5	1,0	0,002	+++	+++
0,000002	0,4	0,5	1,0	0,002	+++	+++
0,000001	0,4	0,5	1,0	0,002	+++	+++
0,002	1,0 NaCl	0,5	1,0	0,002	+++	+++
1,0 NaCl	0,4	0,5	1,0	0,002	+++	+++
					++	++
					+	+
					0	0
					0	0

Ein kurzer Blick auf die letzten drei Tabellen belehrt uns mit Klarheit über die erheblichen Unterschiede in der Reaktionsbreite ein und desselben Eiweißantiserums im Präzipitations- bzw. Komplementbindungsversuch, wobei für den letzteren Fall eine fast 50-fach stärkere Reaktionsbreite erzielt werden konnte, wie bei der Präzipitation und noch dazu mit einer Serumdosis, welche um mehr als die Hälfte niedriger ist, als die im Uhlenhuthschen Versuch verwendete.

Es würde naturgemäß zu weit führen, alle die zahlreichen Auswertungsversuche, die, von kleinen Abweichungen abgesehen, stets zu denselben prinzipiellen Ergebnissen geführt haben, im Detail wiederzugeben, und ich kann mich wohl darauf beschränken, zum Vergleich die wesentlichen Daten

einer größeren Anzahl von Antiseris tabellarisch aneinander zu reihen.

Tabelle V.

Serum No.	Antigen der Vorbehandlung	Präzipitationstiter des Antiserums		Minim. kompl. hemmende Dosis des Serums		Empfindlichkeit der Komplementbindungsreaktion			Ergebnis	
		nach 5 Min.	nach 20 Min.	aktiv	inakt.	Serumdosis		Antigendosis 1 ccm	aktiv	inakt.
						aktiv	inakt.			
291	Pferdeserum	1: 5 000 ±	1: 5 000 ++	0,02	0,02	0,04	0,04	1: 50 000	+++	+++
		1: 10 000 +	1: 10 000 +					1: 100 000	++θ	++θ
342	Eigelb	1: 5 000 +	1: 5 000 ++	0,01	0,01	0,03	0,03	1: 100 000	+++	+++
		1: 10 000 ∓	1: 10 000 +					1: 200 000	+θ	+θ
383	Rinderserum	1: 5 000 +	1: 5 000 ++	0,02	0,02	0,04	0,04	1: 100 000	+++	+++
		1: 10 000 ∓	1: 10 000 +					1: 200 000	+θ	+θ
349	Pferdeserum	1: 5 000 +	1: 5 000 ±	0,01	0,01	0,03	0,03	1: 50 000	+++	+++
		1: 10 000 θ	1: 10 000 ∓					1: 100 000	++θ	++θ
364	Eigelb	1: 5 000 +	1: 5 000 +	0,02	0,02	0,04	0,04	1: 200 000	+++	+++
		1: 10 000 θ	1: 10 000 ∓					1: 500 000	+++	+++
365	dgl.	1: 5 000 +	1: 5 000 ++	0,02	0,02	0,04	0,04	1: 200 000	+++	+++
		1: 10 000 ∓	1: 10 000 +					1: 500 000	++θ	++θ
414	Rinderserum	1: 10 000 +	1: 10 000 +	0,02	0,03	0,04	0,04	1: 20 000	+++	+++
		1: 20 000 ∓	1: 20 000 ±					1: 40 000	+θ	+θ
357	Nieren-eiweiß	1: 5 000 +	1: 5 000 ++	0,04	0,04	0,06	0,06	1: 50 000	+++	+++
		1: 10 000 ±	1: 10 000 +					1: 100 000	++θ	++θ
356	Rinderserum	1: 1 000 +	1: 1 000 ++	0,03	0,03	0,04	0,04	1: 50 000	+++	+++
		1: 5 000 θ	1: 5 000 ±					1: 100 000	+θ	+θ
366	dgl.	1: 1 000 +	1: 1 000 ++	0,035	0,035	0,05	0,05	1: 50 000	+++	+++
		1: 5 000 θ	1: 5 000 θ					1: 100 000	+θ	+θ
329	Ascites v. Menschen	1: 10 000 +	1: 10 000 ++	0,02	0,02	0,03	0,03	1: 200 000	+++	+++
		1: 20 000 ∓	1: 20 000 +					1: 300 000	++θ	++θ
449	Pferdeserum	1: 5 000 +	1: 5 000 ++	0,01	0,01	0,03	0,03	1: 20 000	+++	+++
		1: 10 000 ±	1: 10 000 +					1: 50 000	++θ	++θ
451	dgl.	1: 5 000 +	1: 5 000 ++	0,01	0,01	0,03	0,03	1: 50 000	+++	+++
		1: 10 000 +	1: 10 000 ++					1: 100 000	++θ	++θ
452	dgl.	1: 5 000 +	1: 5 000 ++	0,01	0,01	0,03	0,03	1: 100 000	+++	+++
		1: 10 000 ±	1: 10 000 +					1: 200 000	++θ	++θ
480	Eigelb	1: 5 000 +	1: 5 000 ++	0,01	0,01	0,02	0,02	1: 200 000	+++	+++
		1: 10 000 ±	1: 10 000 +					1: 500 000	++θ	++θ

## Erklärung der Zeichen für Tabelle V und VI.

a) Präzipitationsversuch (Rubr. 3) ++ = scharfe Ringbildung mit starkem Niederschlag; + = scharfe Ringbildung mit mäßigem Niederschlag. ± = diffuse Trübung. ∓ = hauchförmige Trübung. θ = keine Präzipitation.

b) Komplementbindungsversuch (Rubr. 5) +++ = kompl. Hemmung. ++θ = Spur Hämolyse. +θ = fast komplette Hämolyse. θ = komplette Hämolyse.

Tabelle VI.

Serum No.	Antigen der Vorbehandlung	Präzipitationstiter des Antiserums		Minimal komplett hemmende Dosis des Serums		Empfindlichkeit der Komplementbindungsreaktion				Ergebnis	
						Serumdosis		Antigendosis 1 ccm			
		nach 5 Min.	nach 20 Min.	aktiv	inakt.	aktiv	inakt.				
479	Eigelb	1: 5 000 + 1: 10 000 ±	1: 5 000 ++ 1: 10 000 +	0,01	0,01	0,03	0,03	1: 200 000 1: 500 000	+++ ++θ	+++ ++θ	
492	Pferdeserum	1: 5 000 + 1: 10 000 ±	1: 5 000 ++ 1: 10 000 +	0,02	0,02	0,03	0,03	1: 100 000 1: 200 000	+++ ++θ	+++ ++θ	
493	dgl.	1: 5 000 + 1: 10 000 θ	1: 5 000 ++ 1: 10 000 +	0,03	0,03	0,03	0,03	1: 50 000 1: 100 000	+++ ++θ	+++ ++θ	
468	„	1: 1 000 + 1: 5 000 ±	1: 1 000 ++ 1: 5 000 +	0,02	0,03	0,03	0,03	1: 50 000 1: 100 000	+++ +θ	+++ θ	
296	Hammelserum	1: 5 000 + 1: 10 000 ±	1: 5 000 ++ 1: 10 000 +	0,02	0,03	0,04	0,04	1: 100 000 1: 200 000	+++ ++θ	+++ ++θ	
269	Pferdeserum	1: 5 000 + ± 1: 10 000 +	1: 5 000 ++ 1: 10 000 ±	0,03	0,03	0,04	0,04	1: 50 000 1: 100 000	+++ ++θ	+++ ++θ	
291	dgl.	1: 5 000 + 1: 10 000 ±	1: 5 000 ++ 1: 10 000 +	0,01	0,02	0,02	0,04	1: 50 000 1: 100 000	+++ ++θ	+++ ++θ	
342	Eigelb	1: 5 000 + 1: 10 000 ±	1: 5 000 ++ 1: 10 000 +	0,01	0,01	0,03	0,03	1: 500 000 1: 1 000 000	+++ θ	+++ θ	
312	Schweineserum	1: 1 000 + 1: 5 000 θ	1: 1 000 ++ 1: 5 000 ±	0,03	0,03	0,05	0,05	1: 20 000 1: 50 000	+++ +θ	+++ θ	
369	Hammelserum	1: 5 000 + 1: 10 000 +	1: 5 000 ++ 1: 10 000 ±	0,02	0,01	0,04	0,03	1: 50 000 1: 100 000	++θ +θ	+++ ++θ	
383	Rinderserum	1: 5 000 + 1: 10 000 +	1: 5 000 + 1: 10 000 +	0,02	0,02	0,04	0,04	1: 100 000 1: 200 000	+++ ++θ	+++ +θ	
403	Schweineserum	1: 5 000 ± 1: 10 000 ±	1: 5 000 + 1: 10 000 +	0,02	0,02	0,04	0,04	1: 50 000 1: 100 000	+++ +θ	+++ +θ	
407	Pferdeserum	1: 5 000 + 1: 10 000 ±	1: 5 000 ++ 1: 10 000 +	0,02	0,02	0,04	0,04	1: 200 000 1: 500 000	+++ +θ	+++ +θ	
329	Ascites v. Mensch	1: 10 000 + 1: 20 000 ±	1: 10 000 ± 1: 20 000 ±	0,02	0,02	0,03	0,03	1: 200 000 1: 500 000	+++ θ	+++ θ	
477	Eigelb	1: 2 000 + 1: 5 000 ±	1: 2 000 ++ 1: 5 000 +	0,005	0,005	0,02	0,02	1: 50 000 1: 100 000	+++ ++θ	+++ ++θ	
404	Pferdeserum	1: 5 000 ± 1: 10 000 ±	1: 5 000 + 1: 10 000 +	0,035	0,035	0,05	0,05	1: 50 000 1: 100 000	+++ ++θ	+++ ++θ	
491	dgl.	1: 5 000 + 1: 10 000 ±	1: 5 000 ± 1: 10 000 +	0,025	0,02	0,04	0,04	1: 50 000 1: 100 000	+++ θ	+++ θ	

Angesichts von Versuchsergebnissen, wie ich sie in den beiden vorstehenden Tabellen (Tabelle V und VI) niedergelegt habe, scheint mir indessen die Annahme, als ob man mit einem verhältnismäßig häufigen Vorkommen von Antieiweißseris zu rechnen hätte, welche bei hohem Präzipitationswerte

keine oder doch keine nennenswerte komplementbindende Kraft zu entfalten vermöchten, doch nicht so gerechtfertigt, wie es nach den Angaben von Haendel und Steffenhagen den Anschein erwecken könnte. Wenn Haendel und Steffenhagen auch zugeben, daß Antieißsera vorkommen, welche im Vergleich zu ihrer präzipitierenden Wirkung eine stärkere komplementbindende Kraft entfalten können, so geschieht dies doch nur unter der Einschränkung, daß diese Eigenschaft aber nicht ohne weiteres bei jedem präzipitierenden Serum vorausgesetzt werden darf, eine Einschränkung, die im Hinblick auf die an 17 Antieißsera von den genannten Autoren gewonnenen Resultate die Vermutung zuläßt, als ob starke komplementbildende Kraft bei hoher präzipitierender Wirkung geradezu als die Ausnahme zu betrachten wäre, während geringe Bindungsfähigkeit als die Regel zu gelten hätte. Bei aller Würdigung der Befunde von Haendel und Steffenhagen, die ich, wie schon an anderer Stelle erwähnt, in ganz vereinzelt Fällen selbst bestätigen konnte, möchte ich unter Hinweis auf meine Tabellen entschieden betonen, daß das Gros meiner Befunde doch immerhin im Sinne der alten Auffassung spricht, wonach die Komplementbindungsreaktion auch bei Antieißseris als die feinere Methode, und ihr Geltungsbereich als der größere anzusehen ist.

Es ist mir angesichts meiner eigenen Versuchsergebnisse, die ich naturgemäß durch zahlreiche weitere Auswertungsprotokolle ergänzen könnte, kaum verständlich, wie Haendel und Steffenhagen einen so erheblichen Prozentsatz schlechtbindender Antisera feststellen konnten, und trotz mehrfacher einschlägiger Versuche vermag ich mir die erheblichen Differenzen zwischen den Angaben der genannten Autoren und meinen eigenen Feststellungen nur schwer zu erklären. Die Annahme eines Zufalles, wonach Haendel und Steffenhagen gerade Sera der einen, ich solche der anderen Kategorie in Händen gehabt hätten, vermag selbstverständlich eine befriedigende Erklärung nicht zu geben. Den 17 von den genannten Autoren ausgewerteten Antieißseris mit fast durchweg hohem Präzipitationsvermögen, von denen auch nicht ein einziges eine wirklich nennenswerte komplementbindende Kraft entfaltete, stehen in meinen Versuchen 30 Antisera gegenüber,

welche, bei teils höherem, teils mäßigem Präzipitationstiter, durchweg ein gutes, in vielen Fällen sogar ein ganz beträchtliches und jedenfalls um ein Vielfaches höheres Komplementbindungsvermögen im Vergleich zu ihrer präzipitierenden Eigenschaft aufwiesen. Die Erscheinung, daß ein Antiserum bei der Auswertung gegenüber der Antigenmenge von 0,0001 ccm in kleiner Dosis zwischen 0,1 und 0,01 eine komplette Hemmung der Hämolyse bedingte, ist mir bei keinem der vorstehend aufgeführten 30 Antisera, welche wahllos aus meinen einschlägigen Versuchsprotokollen zusammengestellt sind, begegnet. Bei den meisten der ausgewerteten Sera lag die minimale Serumdosis, welche mit der oben angegebenen Antigenmenge noch eine komplette Hemmung der Hämolyse ergab, bei 0,02, während höhere Antiserumdosen, wie 0,03 oder 0,04, nur relativ selten zur Anwendung kommen mußten. Nicht allzu selten war selbst bei einer Antiserumdosis von 0,01 ccm und vereinzelt sogar mit einer solchen von 0,005 ccm eine komplette Hemmung gegenüber der Antigendosis von 0,0001 zu beobachten. Durchschnittlich lag also die minimale komplementbindende Antiserummenge für die fragliche Antigendosis zwischen 0,03 und 0,01 ccm. Für die Stärke der komplementbindenden Wirkung der einzelnen Antisera konnte ich im allgemeinen die auch von Haendel und Steffenhagen gemachte Beobachtung bestätigen, wonach die „stärksten Ausschläge von auch hinsichtlich ihrer präzipitierenden Fähigkeit wirksameren Seris“ erhalten wurden, ohne daß sich jedoch gesetzmäßige Beziehungen zwischen den beiden Valenzen der Antisera und ein absoluter Parallelismus zwischen Präzipitationsstärke bzw. Präzipitatgröße und komplementbindender Fähigkeit feststellen ließ.

Was die Empfindlichkeitsprüfung der Antisera anlangt, die sich jeweils an den eigentlichen Auswertungsversuch anschloß, so habe ich hierfür, wie schon früher erwähnt, nach dem Vorgang von Neisser und Sachs und deren Mitarbeiter meist die  $1\frac{1}{2}$ —2-fache Menge derjenigen Antiserumdosis verwendet, welche mit 0,0001 ccm des Antigens eine komplette Hemmung der Hämolyse ergeben hat. Die Empfindlichkeitsprüfung wurde dabei stets gegenüber fallenden Antigenreihen von 0,01 bis 0,000001 ccm vorgenommen. Hinsichtlich der

Reaktionsbreite bedürfen die genauen tabellarischen Angaben für die einzelnen Antisera wohl kaum eines Kommentars; hinzugefügt sei nur das eine, daß ich bei diesen Versuchsreihen mit den durch den Auswertungsversuch festgestellten optimalen Serummengen fast durchweg regelmäßige Reihen erhielt, bei denen, genau wie in den Versuchen von Haendel und Steffenhagen, den fallenden Antigenmengen eine abnehmende Komplementbindung entsprach. Auch mir sind dabei, analog den Feststellungen der genannten Autoren, Erscheinungen unterlaufen, wonach gegen die stärkeren Antigenmengen überhaupt keine oder doch eine weniger ausgesprochene Komplementbindung auftrat, wie gegenüber den schwächeren Antigenkonzentrationen. Daß bei Wechselwirkung zwischen Antigen und Antiserum im Komplementbindungsversuch optimale Verhältnisse in Frage kommen, die naturgemäß für das eine Serum eine größere Rolle spielen können als für das andere, ist eine längst bekannte, auch von Haendel und Steffenhagen neuerdings wieder hervorgehobene Erfahrungstatsache, die kaum einer weiteren Erörterung bedarf.

Ganz besonders auffällig erscheinen dann aber weiterhin die Angaben von Haendel und Steffenhagen, wonach die von den genannten Autoren untersuchten Antisera nicht nur gegenüber der Antigendosis von 0,0001 keine komplette Hemmung der Hämolyse bewirkten, sondern daß selbst der 10-fach kleineren Antigendosis von 0,001 gegenüber nur ein Teil der Antisera mit kompletter Hemmung in Reaktion trat, während die übrigen wiederum nur mehr oder weniger vollständige Hemmungen bedingten. Eine Erklärung für diese auffällige Erscheinung, daß eine so große Anzahl von hochwertigen präzipitierenden Seris nur eine verhältnismäßig geringe komplementbindende Wirkung entfaltete, vermögen Haendel und Steffenhagen nicht zu geben, sie müssen sich lediglich mit dem Hinweis auf ähnliche von ihnen auch an Immunseris anderer Art gemachten Beobachtungen begnügen.

Wie ich schon mehrfach betont habe, sind mir, wenn auch natürlich ganz vereinzelt, ebenfalls solche Eiweißantisera vorgekommen, welche trotz hohen Präzipitationsvermögens für den Nachweis des fraglichen Antigens im Komplementbindungs-

versuch durchaus unbrauchbar erschienen. Ehe ich auf die Frage nach der Ursache dieser eigentümlichen Erscheinung des näheren eingehe, möchte ich zunächst die Versuchsanordnungen bei zwei eklatanten Beispielen dieser Art in extenso wiedergeben.

a) Präzipitationsversuch.

Tabelle VII (Versuch vom 25. IV.).

0,1 ccm unverdünntes Ascitesantiserum 375 präzipitiert.

Verdünnung des Antigens	Ascites vom Menschen		Verdünnung des Antigens	Ascites vom Menschen	
	n. 5 Min.	n. 20 Min.		n. 5 Min.	n. 20 Min.
1: 100	++	++±	1: 4 000	+	++
1: 500	++	++	1: 5 000	+	++
1: 1000	±±	++	1: 10 000	+	±±
1: 2000	±±	++	1: 20 000	Spur	+

b) Komplementbindungsversuch (25. IV.).

Antigen Ascites	Anti- serum 1: 10	Komplement 10-proz.	Hammel- blut 5-proz.	Ambozeptor Hämolysin	Ergebnis	
					a) aktiv	b) inaktiv
0,0001	1,0	0,5	1,0	0,002	+θ	+θ
0,0001	0,8	0,5	1,0	0,002	+θ	+θ
0,0001	0,6	0,5	1,0	0,002	+θ	+θ
0,0001	0,5	0,5	1,0	0,002	+θ	+θ
0,0001	0,4	0,5	1,0	0,002	+θ	+θ
0,0001	0,3	0,5	1,0	0,002	θ	θ
0,0001	0,2	0,5	1,0	0,002	θ	θ
0,0001	1,0 NaCl	0,5	1,0	0,002	θ	θ
1,0 NaCl	1,0	0,5	1,0	0,002	θ	θ

Die vorstehenden Auswertungstabellen illustrieren in anschaulicher Weise die von Haendel und Steffenhagen bei ihren Antiseris fast regelmäßig gemachten Beobachtungen, daß ein hochwertiges präzipitierendes Antiserum, welches noch dazu eine ganz beträchtliche Präzipitationsstärke aufweist, im Komplementbindungsversuch so gut wie vollkommen versagt, und daß es den Nachweis der üblichen Antigenmenge von 0,0001 nicht mehr in einwandfreier Weise ermöglicht. Keine der angewandten Serumdosen von 0,1 bis 0,01 zeigte in der Tat mit der Antigenmenge von 0,0001 eine auch nur nennenswerte, geschweige denn eine komplette Hemmung der Hämolysse.

Das Ungewohnte dieses Versuchsergebnisses veranlaßte mich im Hinblick auf die von den verschiedensten Autoren



und auch von mir selbst bei der Wassermannschen Reaktion gemachten Erfahrungen über die Bedeutung des Komplementes für das Endergebnis der Reaktion, welche ich auf dem Gebiete der Eiweißdifferenzierung vermittelst des Komplementbindungsverfahrens schon mehrfach hatte bestätigen können, das Antiserum mit einem neuen Komplementserum auszuwerten, da wohl zu erwarten war, daß die auf dem Gebiete der Wassermannschen Reaktion gemachten einschlägigen Beobachtungen auch auf dem Gebiete der Eiweißdifferenzierung Geltung haben müßten. Wie ich vor kurzem an anderer Stelle ausgeführt habe, konnte ich in Uebereinstimmung mit Browning und Mac Kencie, Marg. Stern und anderen durchaus die Erfahrung bestätigen, daß wir je nach der Ablenkungsfähigkeit des jeweils zum Versuch verwendeten Komplementes (leicht und schwer deviable Komplemente!) bei durchaus gleichem hämolytischen Vermögen mit einer größeren oder geringeren Reaktionsbreite ein und desselben Serums zu rechnen haben, und daß diese Differenz gegebenen Falles soweit gehen kann, daß das gleiche Serum mit dem einen Komplement positiv und mit dem anderen negativ reagiert. Mehrfache mit Antieißseris gemachte einschlägige Vergleichsversuche hatten mir die Bedeutung der Deviabilität der einzelnen Komplemente für die Reaktionsbreite der Antisera auch im Eiweißdifferenzierungsversuch dargetan und die nachfolgende Auswertungstabelle mag als Illustration für diese Erscheinung dienen.

Erneuter Auswertungsversuch des Antiserums 375 vom 26. IV.

Tabelle VIII.

Antigen Ascites v. Mensch	Anti- serum 1 : 20	Komplement 10-proz.	Hammel- blut 5-proz.	Ambozeptor Hämolsin	Ergebnis	
					a)aktiv	b) inaktiv
0,0001	1,0	0,5	1,0	0,002	+++	+++
0,0001	0,8	0,5	1,0	0,002	+++	+++
0,0001	0,6	0,5	1,0	0,002	+++	+++
0,0001	0,5	0,5	1,0	0,002	+++	+++
0,0001	0,4	0,5	1,0	0,002	+++	+++
0,0001	0,3	0,5	1,0	0,002	+++	+++
0,0001	0,2	0,5	1,0	0,002	+++	+++
0,0001	0,1	0,5	1,0	0,002	++θ	++θ
1,0 NaCl	1,0	0,5	1,0	0,002	θ	θ
0,0001	1,0 NaCl	0,5	1,0	0,002	θ	θ

Die tabellarischen Aufzeichnungen entsprechen dem Stand des Versuches eine Stunde nach Zusatz des hämolytischen Systems. Im Verlauf der weiteren Beobachtung des Versuches ergab sich noch eine weitere Verschiebung der Versuchsergebnisse insofern, als namentlich bei den geringeren Antiserumdosen eine zum Teil nicht unerhebliche Nachlösung eintrat, die indessen auch bei den stärkeren Dosen nicht vollkommen fehlte. Eine unmittelbar an den Auswertungsversuch, unter Verwendung des gleichen Komplementes angeschlossene Empfindlichkeitsprüfung ergab mit einer als optimal gewählten Serumdosis von 0,03 gegenüber einer Antigenreihe von 0,01 bis 0,000001 ccm eine komplette Hemmung der Hämolyse bis zur Antigendosis von 0,00005 (gleich Verdünnung 1:20000 des Antigens) und selbst bei einer Verdünnung von 1:100000 des Antigens noch eine ausgesprochene (= ++ $\theta$ ) Hemmung der Hämolyse. Auch bei dieser Empfindlichkeitsprüfung war im übrigen die Beobachtung zu machen, daß ungefähr 1 Stunde nach dem definitiven Abschluß des Versuches eine mehr oder minder starke, namentlich in den schwächeren Antigenkonzentrationen ausgeprägte Nachlösung eintrat.

Diese zum Teil sogar nicht unbeträchtlichen Nachlösungen bei einem an sich gut deviablen Komplement mußten den Gedanken nahelegen, daß noch ein weiterer der Bindungsfähigkeit des Antiserums antagonistischer Faktor von Einfluß auf den Ausfall der Reaktion sein könnte. Das Kaninchenserum besitzt ja bekanntlich Normalambozeptoren gegen Hammelblut in wechselnder Menge, eine Tatsache, die nicht immer ohne Einfluß auf die Reaktion sein kann, da hierdurch nicht gerade allzu selten eine unerwünschte Empfindlichkeit des hämolytischen Systems herbeigeführt wird. Außerdem wäre immerhin in Erwägung zu ziehen, ob nicht Faktoren vom Charakter der Komplementoide oder die Komplementoide selbst im einen oder anderen Fall auch bei Antieißseris eine Verschleierung der positiven Reaktion bedingen könnten, so etwa, wie dies Wechselmann für die Wassermannsche Reaktion bei sicherem Luetikerserum beschrieben hat. O. Rossi und unabhängig von ihm Jacobaeus und Mintz haben nun vor einiger Zeit ein Verfahren angegeben, um die störenden Spontanambozeptoren aus dem menschlichen Serum zu ent-

fernen, ein Verfahren, bei welchem nach Angabe der Autoren die Komplementoide gleichzeitig aus dem Serum mit entfernt werden sollen. Im Hinblick auf die immerhin beachtenswerten Ergebnisse der Autoren, auf deren Bedeutung für die Luesdiagnose ich demnächst an anderer Stelle an Hand eigener einschlägiger Versuche zurückkommen werde, habe ich den, wie ich gleich vorausschicken möchte, mehrfach erfolgreichen Versuch gewagt, die Methode auch auf gutpräzipitierende aber dabei schlechtbindende Antisera anzuwenden. Ich werde auf die Methode, deren Prinzip — die Absorption der Ambozeptoren durch die im hämolytischen Versuch verwendete Blutart — ich wohl als bekannt voraussetzen darf, demnächst bei meinen einschlägigen Untersuchungen auf dem Gebiete der Wassermannschen Reaktion zurückkommen, und kann mich an dieser Stelle wohl darauf beschränken, einige in praxi gewonnene Ergebnisse, welche den Effekt dieser Methode zu illustrieren geeignet sind, tabellarisch wiederzugeben. Hinzugefügt mag noch werden, daß die Entfernung der Ambozeptoren naturgemäß nur aus inaktiviertem Serum erfolgen kann. Die Inaktivierung des Serums hat aber, wie ich in Wiederholung früher gemachter Angaben betonen möchte, dabei in den meisten Fällen keinen oder wenigstens keinen nennenswerten Einfluß auf die Reaktionsstärke der Antisera.

## Auswertungsversuch des Antiserums 375 vom 24. IV.

- a) Präzipitation: siehe Tabelle VII.  
b) Komplementbindungsversuch:

Tabelle IX.

Antigen Ascites von Menschen	Anti- serum 1 : 20	Kom- plement 10-proz.	Hammel- blut 5-proz.	Ambo- zeptor (Hämo- lysin)	Ergebnis	
					inak- tiviert	mit Blutkörp. digeriert
0,0001	1,0	0,5	1,0	0,002	+θ	+++
0,0001	0,3	0,5	1,0	0,002	+θ	+++
0,0001	0,6	0,5	1,0	0,002	+θ	+++
0,0001	0,5	0,5	1,0	0,002	+θ	+++
0,0001	0,4	0,5	1,0	0,002	+θ	+++
0,0001	0,3	0,5	1,0	0,002	+θ	+++
0,0001	0,2	0,5	1,0	0,002	θ	++θ
0,0001	0,1	0,5	1,0	0,002	θ	θ
1,0 NaCl	1,0	0,5	1,0	0,002	θ	θ
0,0001	1,0 NaCl	0,5	1,0	0,002	θ	θ

Im Gegensatz zu dem unvorbehandelten, einfach inaktivierten Antiserum 375, welches in Uebereinstimmung mit dem schon früher (Tabelle VII a) aufgeführten Versuch auch hier wiederum eine kaum nennenswerte Bindungsfähigkeit aufwies, hemmte das, nach vorhergehender Inaktivierung, mit Blutkörperchen digerierte Antiserum gegenüber der Antigendosis von 0,0001 bei einer Antiserummenge von 0,03 noch komplett und selbst die Antiserummenge von 0,02 bewirkte noch eine fast komplette Hemmung der Hämolyse, welche auch 24 Stunden nach Beendigung des Versuches kaum eine merkliche Abschwächung erlitten hatte, wie überhaupt bei dieser Art der Vorbehandlung des Serums eine Nachlösung im Versuch nicht zu beobachten war. Mit der optimalen Menge von 0,03 des digerierten Antiserums konnte dann das Antigen der Vorbehandlung noch bis zu einer Verdünnung von 1 : 100 000 durch das Auftreten einer kompletten Hemmung der Hämolyse nachgewiesen werden. Gegenüber den weiteren Antigenverdünnungen reagierte die angegebene Serumdosis jedoch nur noch mit einer mehr oder weniger starken partiellen Hemmung der Hämolyse, wobei die Verdünnung von 1 : 200 000 als diejenige Grenze gelten mußte, bei welcher nach dem Grade der Reaktion (++) ein einwandfreier Nachweis des Antigens eben noch möglich war.

Ich möchte es indessen nicht unterlassen, auf eine Erscheinung hinzuweisen, welche bei dieser Art der Vorbehandlung des Serums in vereinzelten Fällen, wenigstens bei den größten Serumdosen, zur Beobachtung kommen kann. Die Entfernung der Normalambozeptoren kann nämlich gelegentlich das Auftreten des sogenannten Sachsschen Phänomens zur Folge haben, welches zur Entwicklung einer sehr starken antikomplementären Wirkung des Serums führen kann. In der Regel macht sich diese Erscheinung allerdings nur bei den stärkeren Antiserumdosen geltend und auch bei diesen ist sie meist in geringerem Grade ausgeprägt, als es vielfach bei den gleichen Dosen des aktiven unvorbehandelten Serums beobachtet werden kann. Bei den geringeren Dosen, welche ja in der Regel für den eigentlichen Eiweißdifferenzierungsversuch Verwendung finden, habe ich diese Erscheinung so gut wie niemals beobachtet. Praktisch fällt diese Erscheinung

also nur dann ins Gewicht, wenn die Eigenart eines Antiserums gegebenen Falles zur Verwendung höherer Serumdosen zwingt.

In dieselbe Kategorie wie das eben geschilderte Antiserum 375 gehört ein Antiserum gegen Pferdeeiweiß (Kaninchen 503), das ich erst vor kurzem gewonnen und systematisch ausgewertet habe. Auf eine detaillierte Wiedergabe der einzelnen Daten glaube ich verzichten zu können, doch seien die wichtigsten Merkmale des Antiserums kurz skizziert. Im Präzipitationsversuch zeigte dieses Antiserum den Titer von 1 : 10000 bei sehr ausgesprochener Präzipitatgröße. Beim ersten Auswertungsversuch mit Hilfe der Komplementbindung konnte nur bei der Serumdosis von 0,1 eine komplette Hemmung gegenüber der Antigenmenge von 0,0001 beobachtet werden, während schon bei Verwendung einer Serumdosis von 0,08 die Hemmung eine unvollständige wurde. Bei einer Wiederholung des Auswertungsversuches, welche am nachfolgenden Tage mit einem neuen Komplementserum vorgenommen wurde, konnte genau wie bei Antiserum 375 der Effekt wahrgenommen werden, daß die minimale komplett bindende Dosis des Antiserums nur mehr 0,04 ccm für aktives und inaktives Serum betrug, gegenüber 0,08 am vorhergehenden Tage. Den gleichen Effekt wie die Verwendung eines anderen Komplementserums hatte die Entfernung der Normalambozeptoren aus dem inaktivierten Serum. Auch durch diese Art der Vorbehandlung ließ sich eine 10-fach höhere Reaktionsbreite des fraglichen Antiserums erzielen, als mit dem unvorbehandelten Serum.

Ich will damit die Einzelbetrachtungen der Auswertungsversuche abschließen und nur noch in Kürze der Frage näher treten, welche praktischen Konsequenzen sich aus der Beobachtung von Erscheinungen, wie ich sie in der vorstehenden Abhandlung geschildert habe, für das Eiweißdifferenzierungsverfahren und dessen Verwertung für die Antigendiagnose in foro ergeben.

Im Hinblick auf Versuche wie die von Haendel und Steffenhagen, welche ich, wenn auch nur für einzelne Fälle, im Prinzip bestätigen konnte, kann es keinem Zweifel unterliegen, daß wir gegebenen Falles damit rechnen müssen,

daß ein im Präzipitationsversuch hochwertiges Antieweißserum beim Komplementbindungsverfahren vollkommen versagt und den Nachweis einer fraglichen Eiweißart in vorschriftsmäßiger Verdünnung nicht ermöglicht. Auf Grund meiner eigenen Versuchsergebnisse vermag ich mich jedoch, wie ich in Wiederholung früherer Ausführungen nochmals betonen möchte, der Auffassung von Haendel und Steffenhagen, wonach solche Sera verhältnismäßig häufig vorkommen sollen, nicht anzuschließen. Selbst angesichts der Befunde der genannten Autoren möchte ich, eine zweckmäßige Versuchsanordnung vorausgesetzt, das Vorkommen derartiger Antisera doch als eine relativ große Seltenheit betrachten, ohne jedoch die praktische Bedeutung dieser Erscheinung an sich zu verkennen. Ich halte es für selbstverständlich, daß eine derartige Beobachtung, auch wenn sie noch so selten ist, für die praktische Durchführung des Komplementbindungsverfahrens berücksichtigt werden muß und schließe mich der von Sachs ursprünglich aufgestellten, von Haendel und Steffenhagen erneuerten Forderung in vollem Umfange an, daß auch für den Komplementbindungsversuch zum Zweck der Eiweißdifferenzierung, und namentlich für die Antigendiagnose in foro, genau wie bei der Präzipitinmethode nur solche Antisera Verwendung finden sollen und dürfen, welche sich bei einer sorgfältigen systematischen Auswertung in jeder Hinsicht, was Reaktionsbreite und Reaktionsfähigkeit sowie Spezifität anlangt, als einwandfrei erwiesen haben. Gerade unsere Kenntnisse von der Abhängigkeit des Komplementbindungsphänomens von dem jeweils bestehenden gegenseitigen Verhältnis von Antigen und Antiserum wird eine besonders sorgfältige Feststellung der optimalen Serumdosis verlangen und wir würden uns in praxi selbstverständlich nicht damit begnügen können, eine fragliche Eiweißlösung mit einer Antiserumdosis zu untersuchen, welche wir nur in ihrem Bindungsvermögen gegenüber einer willkürlich gewählten Antigenmenge etwa von 0,0001 ccm kennen, sondern wir werden im Interesse möglichst günstiger Resultate vielmehr bedacht sein müssen, im Einzelfalle nach Möglichkeit die optimalen Verhältnisse zwischen Antigen und Antiserum zu ermitteln. Wenn Haendel

und Steffenhagen für die Bestimmung dieser gegenseitigen Verhältnisse die Einstellung des Extraktes nach den etwa für die Präzipitinmethode gültigen Grundsätzen unter Anwendung der von Uhlenhuth vorgeschlagenen Salpetersäurekochprobe fordern, so entspricht es, wie ich an der Hand zahlreicher Eiweißdifferenzierungsversuche feststellen konnte, wohl am ehesten den praktischen Bedürfnissen, den Eiweißgehalt einer fraglichen Lösung, schon mit Rücksicht auf den Vergleich der Versuchsergebnisse, im Komplementbindungsversuch und bei der Präzipitinmethode auf die sonst im Präzipitationsversuch vorgeschriebene Konzentration von 1 : 1000 zu bringen. Ich möchte indessen hier gleich betonen, daß eine einigermaßen sichere Feststellung der optimalen Verhältnisse zwischen Antigen und Antiserum sich nur dann wird ermöglichen lassen, wenn die nach ihrer Herkunft zu bestimmende Eiweißlösung nur eine Eiweißart enthält. In anderen praktischen Fällen, wo wir, wie etwa bei der biologischen Wurstuntersuchung, mit einem Gemisch mehrerer Eiweißarten zu rechnen haben, deren Mischungsverhältnisse wir so gut wie nicht kennen, liegen die Verhältnisse naturgemäß wesentlich komplizierter, da wir hier wohl die optimalen Verhältnisse zwischen Antigen und Antiserum für den Gesamteiweißgehalt des Extraktes, nicht aber für eine im Extrakt vermutete und gesuchte Eiweißart bestimmen können. Für solche Fälle ist es praktisch eben erforderlich, solche Antisera zu verwenden, welche sich bei der Empfindlichkeitsprüfung als reaktionsfähig innerhalb weiter Grenzen der Antigenkonzentrationen erwiesen haben. Daß die Gewinnung derartiger Sera keine wesentliche Schwierigkeit bereitet, bedarf angesichts der ausführlichen Erörterung der einschlägigen Verhältnisse wohl kaum einer weiteren besonderen Betonung. Ich will auf diese rein praktischen Fragen jedoch hier nicht weiter eingehen, da ich hierauf in einer späteren Abhandlung noch näher zurückkommen muß. Nur soweit es sich um das Vorkommen von Antiseris handelt, welche, wie in den Fällen von Haendel und Steffenhagen und den vereinzelt von mir selbst beobachteten Fällen, bei hohem Präzipitationsvermögen keine oder eine nur wenig ausgesprochene komplementbindende

Wirkung entfalten, möchte ich hervorheben, daß das Vorkommen solcher Antisera selbstverständlich keine Kontraindikation gegen die Verwendung des Komplementbindungsverfahrens für die praktische Antigendiagnose in foro bilden kann, wie dies etwa angesichts der Befunde von Haendel und Steffenhagen den Anschein erwecken könnte. Ich glaube zur Genüge darauf hingewiesen zu haben, daß bei entsprechender Technik das Vorkommen solcher Sera überhaupt auf ein Minimum reduziert werden kann, und daß außerdem solche Antisera, wenn sie vorkommen, durch geringfügige technische Kunstgriffe auch für den Komplementbindungsversuch geeignet gemacht werden können. Ein größeres Laboratorium, das sich ständig mit der praktischen Eiweißdifferenzierung befaßt, wird wohl stets eine größere Anzahl gut ausgewerteter Antisera zur Verfügung haben, so daß das Vorkommen solcher Antisera mit schlechtem Bindungsvermögen kaum praktisch ins Gewicht fallen dürfte. Es ist selbstverständlich, daß die biologische Eiweißdifferenzierung für forensische Zwecke im Interesse einer sachgemäßen Durchführung stets die Domäne größerer Laboratorien bleiben muß, die für das Studium der Immunitätsreaktion eingerichtet sind und wo ein erfahrener und mit dem Arbeitsgebiet vertrauter Sachverständiger zur Verfügung steht. An solcher Stelle wird auch die Komplementbindungsreaktion praktisch ihre Kompliziertheit verlieren und auch das gelegentliche Vorkommen von gut präzipitierenden aber schlecht bindenden Antisera wird bei entsprechendem Arbeiten Irrtümer ausgeschlossen erscheinen lassen.

### Zusammenfassung.

In vorstehender Abhandlung konnte an zahlreichen Versuchsbeispielen gezeigt werden, daß bei geeigneter Versuchstechnik das Vorkommen von Antieiweißseris, welche bei starkem Präzipitationsvermögen keine oder eine relativ geringe komplementbindende Kraft entfalten, entgegen den Angaben von Haendel und Steffenhagen eine relativ große Seltenheit darstellt.



Durch entsprechende technische Kunstgriffe, wie Entfernung der Ambozeptoren oder Verwendung gut ablenkbarer Komplementsera, lassen sich auch Antisera mit mangelndem oder geringem Bindungsvermögen für den Komplementbindungsversuch geeignet machen.

Für praktische Zwecke empfiehlt es sich entsprechend den Forderungen von Haendel und Steffenhagen, auch im Komplementbindungsversuch nur sorgfältig ausgewertete Eiweißantisera zu verwenden.

Im Interesse guter Versuchsergebnisse erscheint eine Berücksichtigung der optimalen Verhältnisse zwischen Antigen und Antiserum geboten.

Das Vorkommen eines schlechten Bindungsvermögens bei hochwertigen präzipitierenden Antiseris kann keine Kontraindikation gegen die praktische Verwertung des Komplementbindungsverfahrens für die Antigendiagnose in foro bilden.

#### Literatur.

- Haendel und Steffenhagen, Zeitschr. f. Immunitätsf. u. exp. Therapie, Bd. 7, Heft 3.  
Neisser, M., und Sachs, H., Klin. Jahrb., 1908, Bd. 9.  
Bauer, J., Deutsche med. Wochenschr., 1909.  
— Arb. a. d. Inst. f. exp. Therapie zu Frankfurt a. M.  
— Zeitschr. f. exp. Pathologie u. Therapie, Bd. 17, Heft 3.  
Graetz, Fr., Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 9, Heft 5, 1911.  
— Monatsh. f. prakt. Dermatologie, Bd. 53, 1911.  
Rossi, O., Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 10, Heft 3.  
Jacobaeus, H., Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 8, Heft 5 u. 6.  
Mintz, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 9, Heft 1.
-

*Nachdruck verboten.*

[Aus dem Institut zur Erforschung der Infektionskrankheiten der  
Universität Bern (Direktor: Prof. Dr. W. Kolle).]

### **Versuche über die Wirkungsweise des Atoxyls.**

Von Dr. S. Peschić,

Kgl. Serb. Stabsarzt, Volontärassistent am Institut.

(Eingegangen bei der Redaktion am 28. Februar 1912.)

In den Theorien, welche zur Erklärung der Atoxylwirkung aufgestellt worden sind, kommen bekanntlich zwei Richtungen, die prinzipiell voneinander verschieden sind, zum Ausdruck.

Eine Anzahl von Autoren nimmt an, daß eine Reduktion des Atoxyls im infizierten Körper erfolgen. Diese, namentlich von Ehrlich vertretene Anschauung, wird noch von anderen Forschern geteilt. Ehrlich und Roehl konnten zeigen, daß das Atoxyl durch Reduktion in das sehr stark in vitro mikrobizid wirkende Paramidophenylarsenoxyd übergeführt werden kann. Ebenso wäre die Atoxylwirkung bei den Versuchen von Friedberger (Atoxyl + Thioglycolsäure), von Beck (Atoxyl + Leukocyten), sowie von Levaditi und Yamanouchi (Trypanotoxyl), die einen trypanoziden Effekt des Atoxyls in vitro ergeben haben, auf eine Reduktion im Sinne von Ehrlich zurückzuführen.

Die von Uhlenhuth und anderen vertretene zweite Theorie geht dahin, daß das Atoxyl einerseits die Vermehrung der Trypanosomen bzw. Spirochäten hemmen, andererseits aber hauptsächlich dadurch eine parasitozide Wirkung entfalten soll, daß es auf die Körperzellen einen direkten oder indirekten Reiz ausübt und sie veranlaßt, im größeren Umfange spezifische Antikörper zu produzieren. Für die Theorie sprechen Versuche von Friedberger und Masuda. Diese Autoren konnten eine Steigerung der Antikörperbildung durch die Salvarsanbehandlung bei den mit *Bacillus typhi* und *Vibrio Metschnikoff* infizierten Kaninchen nachweisen.

Lippmann fand vermehrte Antikörperbildung bei Kaninchen, die lange Zeit mit Typhusbacillen vorbehandelt waren

und einen hohen Grad von Immunität erreicht hatten. Als nach einer Pause von 3 Monaten die Agglutinine in Abnahme begriffen waren, zeigte sich eine wiederholte Steigerung derselben nach einigen Atoxylinjektionen.

Aggazi beobachtete eine erhöhte Bildung der Antikörper durch Behandlung der mit abgetöteten Typhusbacillen infizierten Kaninchen mittelst Acid. arsenicum, Atoxyl, Arsenophenylglycin und einer Mischung von Atoxyl und Thioglycolsäuren.

Wenn nun auch nach den neueren Untersuchungen von Rothermundt und Dale anzunehmen ist, daß das Atoxyl an die Parasiten verankert wird und dort, sei es als solches, sei es nach einer durch die Parasitenzelle herbeigeführten Reduktion, auf die Parasitenzelle abtötend wirkt, so bleibt doch die Auslösung von Antikörperwirkung zur Erklärung der starken Wirkung des Atoxyls und wahrscheinlich der meisten Arsenpräparate als ein Faktor zur Erklärung der Phänomene bestehen.

Mit Rücksicht auf die Tatsache, daß nach den Erfolgen der Arsentherapie, namentlich des Salvarsans, die Arsenikalien außerordentlich häufig eingespritzt werden und da auch das Atoxyl bei der Schlafkrankheit in Form von sogenannten Atoxylkuren mehrmals dem Körper einverleibt wird, so ist es von theoretischem und praktischem Interesse, den Mechanismus der Atoxylwirkung nach allen Richtungen experimentell zu klären.

Von diesem Gesichtspunkte wurde die folgende Versuchsanordnung getroffen, bei der zunächst eine Gewöhnung der Tiere durch wiederholte intramuskuläre und stomachale Einverleibung des Atoxyls herbeigeführt werden sollte. Da der tierische Organismus an Arsenik gewöhnt wird, so konnte zu erwarten sein, daß sich durch Atoxyl eine Umstimmung des Körpers erzielen ließe. Wenn das zutrifft, so müßte durch wiederholte Gaben von Atoxyl die Stimulierungsfähigkeit der Zellen und damit die Antikörperbildung herabgesetzt werden, verglichen mit jener der nicht vorbehandelten Tiere. Da bei der Heilung der Spirochätenkrankheit der Hühner die Antikörperbildung eine große Rolle spielt, und da gerade diese Infektion zugleich der medikamentösen Behandlung durch

Atoxyl leicht zugänglich ist, so wurde die Hühnerspirillose als die geeignetste für diese Versuche benutzt. Der hierfür verwandte Stamm des Virus wurde dem Institut durch Herrn Professor Fülleborn in Hamburg überlassen.

Es wurden im ganzen 9 Hühner zum Versuche genommen, die in zwei Gruppen zu gleicher Zeit behandelt wurden.

Der ersten Gruppe, aus 4 Hühnern bestehend, wurde im Laufe von 2 Monaten jeden dritten Tag intramuskulär 0,05 g Atoxyl pro kg Huhn in Lösung von Aq. destillata eingespritzt. Die Injektionen wurden abwechselnd rechts und links ziemlich tief in den Brustmuskel gemacht.

Der zweiten Gruppe von 5 Hühnern wurde das Atoxyl per os gegeben, indem eine Lösung von Atoxyl in Aq. destillata mittelst einer graduierten Tropfpipette langsam eingeträufelt wurde. Dabei war ein Verschütten und eventuelle ungenaue Dosierung ausgeschlossen.

Tabelle I.  
Vorbehandlung der Hühner mit Atoxyl.

	Atoxyl pro kg 0,05 intramuskulär								Atoxyl pro kg 0,05 per os									
Huhn	No. 465		No. 468		No. 469		No. 470		No. 471		No. 472		No. 474		No. 475		No. 476	
Datum	Ge- wicht	Dosis	Ge- wicht	Dosis	Ge- wicht	Dosis	Ge- wicht	Dosis	Ge- wicht	Dosis	Ge- wicht	Dosis	Ge- wicht	Dosis	Ge- wicht	Dosis	Ge- wicht	Dosis
27. IX.	1350	0,07	1290	0,065	1390	0,07	1230	0,06	1170	0,06	1440	0,07	1200	0,06	1390	0,07	1110	0,055
30. IX.	1260	0,065	1280	0,065	1380	0,07	1230	0,06	1140	0,06	1390	0,07	1160	0,06	1360	0,07	1100	0,055
3. X.	1180	0,06	1180	0,06	1310	0,065	1180	0,06	1090	0,05	1230	0,06	1040	0,05	1350	0,07	1100	0,055
6. X.	1180	0,06	1230	0,06	1360	0,07	1200	0,06	1240	0,06	1320	0,065	1000	0,05	1370	0,07	1170	0,06
9. X.	1090	0,055	1290	0,065	1250	0,065	1170	0,06	1260	0,065	1390	0,07	970	0,05	1350	0,07	1110	0,055
12. X.	1180	0,06	1230	0,06	1190	0,06	1140	0,06	1240	0,065	1330	0,065	1000	0,05	1350	0,07	1120	0,055
15. X.	1140	0,06	1260	0,06	1270	0,065	1200	0,06	1180	0,06	1300	0,065	930	0,05	1250	0,065	1100	0,055
18. X.	1150	0,06	1200	0,06	1180	0,06	1220	0,06	1200	0,06	1240	0,065	940	0,05	1240	0,065	1100	0,055
21. X.	1000	0,05	1070	0,055	1120	0,06	1080	0,055	1070	0,055	1130	0,055	900	0,05	1230	0,06	1000	0,05
24. X.	1130	0,06	1210	0,06	1130	0,055	1180	0,06	1290	0,065	1220	0,06	990	0,05	1300	0,065	1070	0,055
27. X.	1110	0,06	1170	0,06	1130	0,06	1230	0,06	1250	0,065	1260	0,06	1050	0,05	1300	0,065	1100	0,06
30. X.	1110	0,07	1100	0,065	1100	0,07	1250	0,075	1280	0,075	1210	0,07	1090	0,07	1250	0,075	1130	0,07
2. XI.	1190	0,075	1160	0,07	1180	0,075	1260	0,075	1390	0,08	1200	0,075	1120	0,07	1370	0,08	1150	0,07
5. XI.	1120	0,07	1190	0,07	1090	0,07	1290	0,08	1300	0,08	1080	0,07	1090	0,07	1350	0,08	1090	0,07
8. XI.	1110	0,07	1230	0,075	1070	0,07	1220	0,075	1190	0,07	1150	0,07	1160	0,07	1350	0,085	1110	0,07
11. XI.	1080	0,07	1250	0,075	1070	0,07	1240	0,075	1210	0,08	1210	0,075	1100	0,07	1390	0,09	1100	0,07
14. XI.	1050	0,07	1210	0,075	1090	0,07	1130	0,07	1150	0,08	1160	0,075	1110	0,07	1250	0,08	1090	0,07
17. XI.	1040	0,07	1220	0,075	1070	0,07	1150	0,075	1280	0,08	1250	0,075	1080	0,07	1370	0,08	1050	0,07
20. XI.	1110	0,07	1200	0,075	1100	0,07	1140	0,07	1340	0,08	1300	0,08	1120	0,07	1360	0,08	1120	0,07
23. XI.	1080	0,07	1200	0,075	1100	0,07	1050	0,07	1320	0,08	1300	0,08	1100	0,07	1300	0,08	1060	0,07

Somit bekam jedes Huhn im Laufe von 2 Monaten 20 Atoxyldosen, im ganzen ca. 1,10 g Atoxyl. Die Einzeldosis wurde nach 12 Gaben auf 0,06 erhöht. Noch größere Dosen zu geben war nicht ratsam, da die Gefahr bestand, die Tiere toxischen Schädigungen mit häufigen und noch größeren Dosen auszusetzen. Die toxische Dosis bei subkutaner Injektion liegt, wie die Tabelle II zeigt, zwischen 0,08—0,10 g pro kg Huhn.

Tabelle II.  
Bestimmung der wirksamen Dosen des Atoxyls.

1. Tag	Infektion mit 0,5 ccm pro kg Huhn einer Blutverdünnung					
	Huhn No. 1	Huhn No. 2	Huhn No. 3	Huhn No. 4	Huhn No. 5	Huhn No. 6
2. Tag	0	—	—	—	—	—
3. „	+w Atox. 0,1 g	+w Atox. 0,08 g	+w Atox. 0,06 g	+w Atox. 0,03 g	+w Atox. 0,025 g	+w Atox. 0,02 g
4. „	†	—	—	+	+	+
5. „	—	—	—	+	++	++
6. „	—	—	—	—	—	+
7. „	—	†	—	—	—	—
8. „	—	—	—	—	—	—

Wenn man berücksichtigt, daß die Dosis zwischen 0,06 und 0,08 g sich befindet, so sind es also recht erhebliche Mengen von Atoxyl, die den Hühnern beigebracht wurden.

Die Tiere zeigten während der ganzen Zeit, in welcher sie mit Atoxyl vorbehandelt waren, ein verschiedenes, schwankendes Verhalten in bezug auf ihr Befinden. Das Gewicht zeigte im Anfange eine Abnahme bei fast allen Tieren. Am Ende der Behandlung mit Atoxyl zeigten 8 Tiere eine Verminderung ihres Anfangsgewichtes um ca. 100 g, nur eines zeigte eine Gewichtszunahme um ca. 50 g.

Nach Verlauf von 2 Monaten, während welcher Zeit die Hühner unter der Vorbehandlung mit Atoxyl standen, wurde eine Pause von 18 Tagen gemacht. Dann wurden sämtliche 9 Hühner mit *Spirochaeta gallinarum* intramuskulär infiziert. Die Dosis war 0,50 ccm pro kg Huhn einer 20-proz. Verdünnung des spirochätenhaltigen Blutes in physiologischer NaCl-Lösung.

Am zweiten Tage nach der Infektion ergab die mikroskopische Untersuchung des Blutes mit Hilfe von Burris Tuscheverfahren +w. Zur genauen Beurteilung des mikro-

skopischen Befundes bei der Blutuntersuchung diene uns als Maßstab das folgende, von Ehrlich-Hata eingeführte Schema:

- +w = 1 Spirochäte in 50 Gesichtsfeldern.
- + = einige Spirochäten in 50 Gesichtsfeldern.
- ++ = 1 Spirochäte in jedem Gesichtsfelde.
- +++ = mehrere Spirochäten in kleinen Bündeln in jedem Gesichtsfelde.
- ++++ = zahlreiche Spirochäten in großen Knäueln in jedem Gesichtsfelde.

Am selben Tage, wo die Untersuchung ein +w zeigte, wurde 3 Hühnern aus der ersten und 4 Hühnern aus der zweiten Gruppe der vorbehandelten die Heildosis von Atoxyl intramuskulär eingespritzt. Wie aus Tabelle II zu ersehen ist, bewegt sich die Dosis curativa bei dem von mir benutzten Spirochätenstamm zwischen 0,02—0,06 pro kg. Deshalb wurden auch die verschiedenen Dosen gegeben, und einem Huhn wurde sogar die Dosis 0,01, d. h. die Hälfte der Dosis efficax pro kg einverleibt.

Die Hühner wurden täglich auf Spirochäten untersucht und genau beobachtet.

Als Kontrollen wurden 4 Hühner benutzt: je eines von jeder Gruppe der vorbehandelten und ein normales Huhn, die infiziert, aber nicht mit Atoxyl behandelt wurden und ein zweites normales Huhn, welches infiziert und behandelt wurde.

Als Resultat ergab sich folgendes: Bei allen mit Atoxyl behandelten Tieren, den vorbehandelten wie bei dem normalen, verschwanden die Spirochäten prompt nach der Einverleibung des Atoxyls. Dagegen gingen alle 3 Kontrollhühner, die ohne Behandlung mit Atoxyl gelassen wurden, am 4. Tage nach der Infektion zugrunde. (Siehe Tabelle III auf p. 369.)

Bei diesen Versuchen wurde die Tatsache festgestellt: Es findet durch 20mal wiederholte Atoxylgaben keine Angewöhnung an die Reizwirkung des Atoxyls, weder bei den Tieren, denen das Atoxyl intramuskulär, noch bei denjenigen, denen es per os beigebracht wurde, statt. Die Dosen, mit welchen die mit Atoxyl vorbehandelten Hühner geheilt wurden, waren zum Teil viel niedriger als diejenigen, mit welchen bei normalen Hühnern sichere Heilung erzielt war. Es genügte

Tabelle III.

Die Wirkung des Atoxyls auf vorbehandelte Hühner.

Huhn No.	11. XII.		13. XII.		14. XII.	15. XII.	16. XII.	17. XII.	18. XII.
	Ge- wicht	Infekt. pro kg	Mikr. Befund	Atoxyl pro kg					
465	1140	0,55	+ w	0,05 = 0,055	+ w	—	—	—	—
468	1230	0,65	+ w	0,05 = 0,06	—	—	—	—	—
469	1100	0,55	+ w	0,035 = 0,0385	+ w	—	—	—	—
471	1390	0,7	+ w	0,05 = 0,0625	—	—	—	—	—
472	1290	0,65	+ w	0,025 = 0,02875	—	—	—	—	—
475	1150	0,6	+ w	0,05 = 0,06	—	—	—	—	—
476	1150	0,6	+ w	0,01 = 0,011	++(+)	++++	++	—	—
Kontrollen.									
470	1110	0,55	+ w	—	+(+)	+++	+	—	—
474	1090	0,55	+ w	—	++(+)	++++(+)	+	—	—
Normal- huhn No. I	1020	0,5	+ w	0,035	+ w	—	—	—	—
Normal- huhn No. II	1200	0,6	+ w	—	+(+)	++(+)	++++	+	—

sogar, wie man aus Tabelle III ersehen kann, eine minimale Heildosis, um das Verschwinden der Spirochäten zu erzielen.

Dieses Ergebnis, das gegen die Annahme einer Wirkung des Atoxyls durch Reizwirkung auf die Zellen spricht, steht in Uebereinstimmung mit den Befunden Cloëtta's, die er bei stomachaler Arsenikverabreichung erhielt. Cloëtta stellt die Arsengewöhnung bei stomachaler Verabreichung des Arseniks in Abrede. Ein Hund, der, wie Cloëtta schreibt, viele Gramme Arsenik per os jahrelang vertragen hat, zeigte bei intramuskulärer Verabreichung des Arseniks keine größere Toleranz gegenüber den Kontrolltieren und ging nach kurzer Zeit an akuter Arsenikvergiftung zugrunde. Die große Arsentoleranz per os bei diesem Hunde führt Cloëtta auf die Veränderungen der Darmepithelien zurück, die das einverleibte Arsenik nicht mehr durchlassen.

Diese Tatsache ist um so auffälliger, als Cloëtta bei per os mit Arsenik behandelten Kaninchen fand, daß sich die Wirkung des Arseniks nicht nur in einer Vermehrung des

Körperfettes zeigt, sondern auch auf die Verstärkung des Eiweißstoffwechsels erstreckt, die auf der vermehrten Tätigkeit der Zellen beruht.

Für die therapeutische Praxis läßt sich aus diesen Versuchen mit dem Vorbehalt, daß sich die Säugetiere und die Menschen ebenso wie die Hühner verhalten, der Schluß ziehen, daß selbst öfter wiederholte Atoxyleinspritzungen die spirillozide Wirkung einer *dosis minima efficax* des Medikamentes nicht beeinträchtigen.

Zum Schlusse ist es mir eine angenehme Pflicht, Herrn Prof. Dr. W. Kolle für die Ueberlassung des Themas und die Leitung bei der Ausführung der Arbeit aufrichtigen Dank zu sagen. Ebenso danke ich Herrn Dr. M. Rothermundt, 1. Assistenten am Institut, für gütige Unterstützung bei dieser Arbeit.

#### Zusammenfassung.

1) Bei Hühnern wird selbst durch oftmals wiederholte Injektionen von Atoxyl die prompte spirillozide Wirkung des Medikaments, wenn es einige Zeit nach der letzten Atoxyl-injektion in *dosis minima efficax* gegeben wird, nicht beeinträchtigen.

2) Diese Tatsache gibt experimentelle Unterlagen für die Annahme, daß die Wirkung des Atoxyls nicht allein oder wesentlich in der Entfaltung eines Reizes auf die Zellen und dadurch bedingter Antikörperbildung zu suchen ist, sondern in direkt chemotherapeutischen Effekten im Sinne des Parasitotropismus nach P. Ehrlich.

#### Literatur.

- Ehrlich-Hata, Die experimentelle Chemotherapie der Spirillosen, 1910.  
Friedberger, Berl. klin. Wochenschr., 1908.  
— und Masuda, Therap. Monatshefte, 1911.  
Uhlenhuth, Arbeiten a. d. Kaiserl. Gesundheitsamt, 1908.  
Levaditi, Comptes rendus Soc. Biologie.  
Lippmann, Deutsche med. Wochenschr., 1911.  
Agazzi, Zeitschr. f. Immunitätsforsch., Bd. 1, 1909.  
Rothermundt und Dale, Deutsche med. Wochenschr., 1911.  
Cloëtta, Korrespondenzbl. f. Schweizer Aerzte, 1911.  
Beck, Zeitschr. f. Immunitätsforsch., Bd. 8, 1910.



*Nachdruck verboten.*

[Aus dem Königl. Institut für experimentelle Therapie in Frankfurt a. M. (Direktor: Wirkl. Geheimer Rat Prof. Dr. P. Ehrlich).]

## **Ueber Ausflockung von Mastixemulsionen.**

Von **H. Sachs.**

(Eingegangen bei der Redaktion am 6. März 1912.)

Eine vor kurzem erschienene interessante Arbeit von Gengou<sup>1)</sup> über die „Konglutination“ des Mastix gibt mir Veranlassung, kurz einige Erfahrungen über die Ausflockung von Mastixemulsionen mitzuteilen, die ich bereits vor längerer Zeit, zum Teil in Gemeinschaft mit Herrn Dr. Manwaring, gewonnen habe. Gengou hat als Mastixkonglutination ein Phänomen beschrieben, das in der Ausflockung einer geeignet hergestellten Mastixsuspension durch aktive Sera oder durch die Kombination eines inaktivierten und eines aktiven Serums besteht, und das er mit der von Bordet und Gay zuerst beschriebenen und als „Konglutination“ bezeichneten Agglutination von ambozeptorbeladenen Zellen durch das Zusammenwirken von Komplement und einem in inaktiven Seris, besonders im inaktiven Rinder Serum vorhandenen Stoffe vergleicht. Es ist an dieser Stelle nicht meine Absicht, auf das Wesen und den Mechanismus dieser Erscheinungen näher einzugehen. Vielmehr soll hier nur die Frage der Bedeutung der Mastixbereitungsart auf die Ausflockbarkeit behandelt werden. Nach Gengou eignet sich nämlich die in üblicher Weise durch Verdünnen einer alkoholischen Stammlösung mit destilliertem Wasser hergestellte Mastixemulsion nicht für die Demonstration der nur durch aktives Rinder Serum (oder auch durch andere aktive Sera) bedingten Ausflockung, zumal die derart gewonnenen Mastixemulsionen der fällenden Wirkung der Salze gegenüber sehr empfindlich sind. Da die Salzempfindlichkeit nach Porges zu einem wesentlichen Teil durch den Alkoholgehalt veranlaßt ist, hat Gengou die Mastixmasse aus einer gewöhnlichen Emulsion durch NaCl

1) O. Gengou, Diese Zeitschrift, Bd. 11, 1911, p. 725.

ausgefällt und das Präzipitat in destilliertem Wasser aufgenommen. Derart wurden genügend stabile Suspensionen erhalten, welche der Wirkung von Salzen gegenüber wenig empfindlich waren und mit 0,9-proz. NaCl besalzen werden konnten. Diese Mastixsuspensionen ergaben dann das von Gengou beschriebene Konglutationsphänomen.

Wie nun bereits vor mehreren Jahren von mir ausgeführte Versuche zeigen, ist für eine Veränderung der Salzempfindlichkeit des Mastix die Entfernung des Alkohols nicht unbedingt erforderlich. Man kann vielmehr auch in üblicher Weise Emulsionen sehr differenter Salzempfindlichkeit bereiten trotz identischer Zusammensetzung in bezug auf Alkoholgehalt und Konzentration des Mastix. Die Versuche, über die ich mir zu berichten erlaube, nahmen ihren Ausgangspunkt von der durch mich in Gemeinschaft mit Rondoni<sup>1)</sup> festgestellten Bedeutung des Einflusses der Verdünnung alkoholischer Organextrakte auf ihre Beschaffenheit. Es wurde damals gezeigt, daß die Verdünnungen alkoholischer Extrakte, je nachdem sie durch schnelles oder langsames Vermischen mit physiologischer Kochsalzlösung hergestellt sind, sich einerseits bereits äußerlich durch den Grad ihrer Trübung unterscheiden, andererseits aber auch in ihrem Verhalten bei der Wassermannschen Syphilisreaktion sehr markante Differenzen aufweisen können. Wir konnten gleichzeitig berichten, daß die Abhängigkeit der äußeren Beschaffenheit der Verdünnungen alkoholischer Stammlösungen von der Art ihrer Herstellung ein Phänomen ist, das nicht auf lipoidartige Stoffe beschränkt ist, sondern auch für andere Kolloide zutrifft, indem einige orientierende, von Herrn Dr. Altman ausgeführte Versuche erhebliche Differenzen beim Verdünnen einer alkoholischen Mastixlösung mit Wasser gezeigt hatten.

In der Tat weisen Verdünnungen von alkoholischen Mastixlösungen die größten Differenzen auf, wenn die Schnelligkeit des Verdünnens variiert. Ich unterscheide in folgendem kurz zwischen rascher und fraktionierter Verdünnung bei der Herstellung der Mastixemulsionen und bezeichne die rasch verdünnte Lösung als Mastix A, die fraktioniert verdünnte als Mastix B.

1) H. Sachs und P. Rondoni, Berl. klin. Wochenschr., 1908, No. 44.

Als Ausgangslösung diene eine 1-proz. Mastixlösung in Alkohol. Mastix A wird gewonnen durch rasches Hineinblasen von 10 ccm alkoholischer Mastixlösung in 90 ccm destillierten Wassers.

Mastix B wird in der Weise hergestellt, daß zu 10 ccm alkoholischer Mastixlösung 90 ccm destillierten Wassers möglichst langsam tropfenweise und unter stetigem Schütteln zugesetzt werden.

Beide Mastixemulsionen enthalten also übereinstimmend 0,1 Proz. Mastix und 10 Proz. Alkohol, und trotzdem ist bereits ihr äußeres Aussehen von der größten Differenz. Mastix A ist eine nur schwach opaleszierende durchscheinende Emulsion, Mastix B ist eine intensiv milchig getrübe Flüssigkeit, ohne aber dabei irgendwelche suspendierte Partikelchen erkennen zu lassen.

Von Interesse ist nun die Tatsache, daß sich Mastix A und B auch bei der Fällung durch Kochsalz ganz different verhalten, indem die klare Mastixemulsion A gegenüber der ausflockenden Wirkung des Salzes sehr empfindlich ist im Gegensatz zu dem Verhalten des trüben Mastix B.

Zur Demonstration dieser Tatsache werden absteigende Mengen einer 10-proz. Kochsalzlösung (mit destilliertem Wasser auf ein Flüssigkeitsvolumen von 1 ccm aufgefüllt) mit je 1 ccm Mastix A, resp. Mastix B digeriert. Das Ergebnis zeigt Tabelle I<sup>1)</sup>.

Tabelle I.

10-proz. NaCl ccm	1,0 Mastix A		1,0 Mastix B	
	sofort	nach 2 Stunden	sofort	nach 2 Stunden
1,0	+++	+++	?	+++
0,5	+++	+++	0	+++
0,4	+++	+++	0	?
0,3	+++	+++	0	0
0,25	+++	+++	0	0
0,2	+++	+++	0	0
0,15	+++	+++	0	0
0,1	+++	+++	0	0
0,075	0	0	0	0

1) In dieser und den folgenden Tabellen ist die Stärke der Präzipitation schätzungsweise mit +++, ++, +, ?, 0 bezeichnet.

Wie die Tabelle I zeigt, tritt die Ausflockung des Mastix A noch bei einem Kochsalzgehalt von mindestens 0,5 Proz. ein, während Mastix B eine 4—5-fach stärkere Stabilität besitzt<sup>1)</sup>. Der gleiche Unterschied ergibt sich in dem Verhalten gegenüber Salzsäure, wofür in Tabelle II ein Versuchsbeispiel angeführt sei.

Tabelle II.

Normal-HCl ccm <sup>2)</sup>	1,0 Mastix A		1,0 Mastix B	
	sofort	nach 2 Stunden	sofort	nach 2 Stunden
0,1	+++	+++	?	+++
0,05	+++	+++	0	+++
0,025	+++	+++	0	++
0,015	+++	+++	0	++
0,01	+++	+++	0	+
0,005	+++	+++	0	0
0,0025	+++	+++	0	0
0,0015	?	++	0	0
0,001	?	++	0	0
0,0005	0	0	0	0

Mastix B ist also gegenüber Salzsäure etwa 10mal unempfindlicher als Mastix A, ein Unterschied, der bei Beobachtung des Ausflockungseffektes sofort nach dem Mischen noch erheblich größer erscheint.

Was nun das Verhalten der beiden Mastixemulsionen gegenüber Serum anlangt, so wurde zu den folgenden Versuchen Rinderserum benutzt, das einerseits im aktiven, andererseits im inaktiven Zustande (nach  $\frac{1}{2}$ -stündigem Erhitzen auf 55°) zur Anwendung gelangte. Zunächst ist in Tabelle III ein Versuchsbeispiel notiert, in welchem das Verdünnen des Rinderserums in destilliertem Wasser erfolgte, so daß das Medium außer dem Salzgehalt der verschiedenen Serumdosen als salzfrei gelten kann. (Volumen: 2 ccm.)

1) Auch die Art des Präzipitates ist verschieden. Bei Mastix A bildet sich eine mehr gelatinöse Flockung, welche erst an die Oberfläche der Flüssigkeit steigt und später meist zu Boden sinkt, bei Mastix B erscheint der erheblich langsamer und erst bei höherer Salzkonzentration eintretende Niederschlag zunächst feinflockiger und später dichter.

2) Gesamtvolum = 2 ccm.

Tabelle III.

Mengen des Rinder- serums ccm	Ausflockende Wirkung des			
	aktiven Rinderserums		inaktiven Rinderserums	
	1,0 Mastix A	1,0 Mastix B	1,0 Mastix A	1,0 Mastix B
1,0	0	++	0	++
0,5	++	+++	+	++
0,25	+	+++	+	++
0,15	0	++	0	?
0,1	0	?	0	0
0	0	0	0	0

Auch hier zeigt sich also ein deutlicher Unterschied im Verhalten des Mastix A und B, indem durch Mastix B eine stärkere Ausflockung bedingt wird als durch A. Es handelt sich dabei wohl wesentlich um eine Verstärkung der durch das Verdünnen mit salzfreiem Medium verursachten Globulin-fällung. Dem entspricht auch die Abschwächung der Ausflockung nach dem Inaktivieren des Serums. Von einem gewissen Interesse ist aber vielleicht die Tatsache, daß die Verstärkung der Präzipitation durch den, Salz und Säure gegenüber wenig empfindlichen Mastix B in höherem Grade geschieht als durch Mastix A, und man könnte daher daran denken, bei solchen Fällungsreaktionen, die auf einer Ausflockung der Globuline basieren (Klausnersche Reaktion etc.), eine größere Sinnfälligkeit durch den Zusatz von Mastix B anzustreben.

Wenn man nun absteigende Serummengen mit Mastix bei einem Salzgehalt von etwa 0,85 Proz. digeriert, so erhält man ein Phänomen, welches dem von Gengou beschriebenen entsprechen dürfte.

#### Absteigende Mengen

##### I. aktiven Rinderserums

##### II. inaktiven Rinderserums

werden (mit 0,85-proz. NaCl-Lösung auf 1,0 ccm Volumen aufgefüllt):

a) mit je 1 ccm Mastix A,

b) mit je 1 ccm Mastix B

unter Zusatz von je 0,2 ccm 4-proz. NaCl digeriert. Das Ergebnis ist nach 2-stündigem Verweilen der Röhrchen im Brutschrank notiert (vgl. Tabelle IV).

Tabelle IV.

Mengen des Rinder- serums ccm	Fällende Wirkung von Rinderserum			
	I. aktiv		II. inaktiv	
	a) Mastix A	b) Mastix B	a) Mastix A	a) Mastix B
1,0	0	+++	0	0
0,5	0	+++	0	0
0,25	0	++	0	0
0,15	0	+	0	0
0,1	?	0	0	0
0,05	?	0	0	0
0,025	+	?	?	0
0,015	+	?	+	0
0,01	+++	+	+++	?
0,005	+++	+	+++	?
0,0025	+++	++	+++	?
0,0015	+++	++	+++	+
0,001	+++	+++	+++	+
0,0005	+++	+++	+++	+++
0,000025	+++	+++	+++	+++
0,000015	+++	++	+++	+++
0,00001	+++	++	+++	++
0	+++	0	+++	0

Wie die Tabelle zeigt, ergeben sich aus einem Vergleich der ersten, die größeren Serummengen enthaltenden Glieder der einzelnen Kolonnen ganz ähnliche Verhältnisse, wie sie von Gengou beschrieben sind. Einmal ist eine Präzipitation nur bei Verwendung aktiven, nicht des inaktiven Rinderserums eingetreten. Dann aber ist diese Ausflockung nur bei bestimmter Herstellungsart der Mastixemulsion zu erzielen, und zwar tritt sie nur bei Verwendung des durch fraktionierte Verdünnung bereiteten Mastix B ein<sup>1)</sup>. Man erhält also durch die Variation der Verdünnungsart auf sehr einfache Weise alkoholhaltige Mastixemulsionen, die bei gleichem Alkohol- und Mastixgehalt sich gegenüber der flockenden Wirkung aktiven Rinderserums sehr markant unterscheiden, ebenso wie die von Gengou auf zweierlei

1) Auch bei alkoholischen Lecithinemulsionen, die in entsprechender Weise bereitet wurden, zeigte sich die bei weitem bessere Eignung der fraktioniert hergestellten Verdünnungen zur Ausflockung durch Rinderserum, das aber im inaktivierten Zustande annähernd gleich stark wirkte (cf. hierzu Toyosumi). Gegenüber HCl-Wirkung wurden beim Lecithin Differenzen nicht beobachtet.

Weise — einerseits durch Aufnahme der Kochsalzfällung, andererseits durch Aufnahme des Sedimentes bei der Filtration durch Kollodiumfilter — hergestellten wässerigen Suspensionen des Mastix.

Die in Tabelle IV zum Ausdruck gelangende, bei geringeren Serumengen eintretende Ausflockung entspricht der bereits seit den Untersuchungen von M. Neisser, Friedemann<sup>1)</sup>, Bechhold<sup>2)</sup> [vgl. auch Porges<sup>3)</sup>] bekannten Tatsache, daß Blutserum im Verein mit an und für sich unwirksamen Salzmengen Fällungen bedingt, im Ueberschuß aber ausflockungshemmend wirkt. Der Unterschied, welcher auch in dieser Hinsicht zwischen Mastix A und Mastix B besteht, erklärt sich wohl aus ihrem verschiedenen Verhalten gegenüber der ausflockenden Wirkung der Salze. Während bei Mastix A die physiologische Kochsalzkonzentration bereits zur Ausfällung genügt, tritt die letztere bei Mastix B erst bei Zusatz geringer Serumengen ein und ist auf eine engere Zone beschränkt.

Es sei noch bemerkt, daß bei geringerem Salzgehalt (0,425-proz.) der Flüssigkeit die obere Fällungszone bis zu wesentlich geringeren Serumdosen (0,015 ccm) reichte. Inaktives Serum bewirkte unter diesen Bedingungen erst in erheblich größeren Dosen (1,0—0,5 ccm) eine Fällung, und die Ausflockung trat auch hier ausschließlich bei Verwendung des Mastix B ein. Durch Steigerung der Kochsalzkonzentration (1,5—2,0-proz.) erschien die Flockungszone aufgehoben.

### Zusammenfassung.

Es gelingt, durch verschieden rasche Verdünnungen alkoholischer Mastixlösungen mit Wasser Emulsionen zu erhalten, die sich bereits äußerlich durch den Grad der Trübung sehr wesentlich unterscheiden. Die rasch verdünnte, relativ klare Emulsion A ist Salzen und Säuren gegenüber sehr empfindlich im Gegensatz zu der langsam verdünnten trüben

1) M. Neisser und U. Friedemann, Münch. med. Wochenschr., 1904, No. 11.

2) H. Bechhold, Zeitschr. f. physik. Chemie, Bd. 48, 1904.

3) O. Porges, Centralbl. f. Bakt., Bd. 40, 1905.

Emulsion B, eine Tatsache, die für die Methodik der Fällungen von Mastix und anderer kolloidaler Emulsionen von Bedeutung sein dürfte. Das von Gengou für Mastixsuspensionen beschriebene Phänomen der Ausflockung durch aktives Serum konnte auch bei Verwendung der Mastixemulsion B demonstriert werden. Gegenüber der Ausflockung durch größere Mengen aktiven Serums verhalten sich also Mastix A und B umgekehrt, wie gegenüber der fällenden Wirkung von Kochsalz und Salzsäure.

---

*Nachdruck verboten.*

[Aus dem Institut für Hygiene und Bakteriologie der Universität Straßburg i. E. (Direktor: Geheimrat Prof. Dr. Uhlenhuth).]

### **Zur Technik der Agglutination.**

Von Dr. Th. Messerschmidt,  
Assistent des Instituts.

Mit 3 Figuren im Text.

(Eingegangen bei der Redaktion am 6. März 1912.)

Die von Gaetgens<sup>1)</sup> angegebene Agglutinationstechnik wird in der Weise angestellt, daß die nach der Gruber-Widalschen Vorschrift mit Patientenserum und Bakterienaufschwemmung beschickten Gläschen sofort nach dem Füllen ungefähr 10 Minuten zentrifugiert werden. Nach dieser Zeit zeigt der Bodensatz eine solch charakteristische Form (siehe Fig. 3 und Arb. a. d. Kaiserl. Ges.-Amt), daß aus ihr die Diagnose auf Agglutination leicht zu stellen ist. In Grenzfällen ist durch Aufschütteln des Sediments und Betrachten mit der Lupe die Agglutination zu erkennen.

Diese Technik wird seit Jahren im hiesigen Institut täglich geübt und hat sich bei einem Untersuchungsmaterial von vielen tausend Fällen gut bewährt. Ihr besonderer Vorteil liegt darin, daß die zur Agglutination erforderliche Zeit wesentlich

---

1) W. Gaetgens, Beitrag zur Agglutinationstechnik. Münch. med. Wochenschr., 1906, p. 1351; Arb. a. d. Kaiserl. Ges.-Amt, Bd. 25, p. 218.



abgekürzt wird. Bereits 15—20 Minuten nach dem Einliefern des verdächtigen Blutes kann das Resultat der Agglutination bekannt sein.

Nun gehören aber zu einer größeren Zahl von Untersuchungen, wie sie in bakteriologischen Untersuchungsstationen ausgeführt werden, entsprechend viele Zentrifugen. Die gebräuchlichen sind ja meistens für nur 4 Gläschen eingerichtet.

Die Betrachtung des Bodensatzes erfordert für den Untersucher eine recht unbequeme Haltung. Das macht sich besonders bei zahlreichen Untersuchungen unangenehm bemerkbar. Der Untersucher muß die Gläschen einzeln mit ausgestrecktem Arm heben und seinen Kopf weit in den Nacken legen, um den Bodensatz genau betrachten zu können. Beide Ungelegenheiten suchte ich zufolge einer Anregung von Herrn Geh.-Rat Prof. Dr. Uhlenhuth zu heben.

Ich glaube, daß mir das mit folgendem Apparat gelungen ist. Die Fig. 1 zeigt eine Wasserzentrifuge, von der der

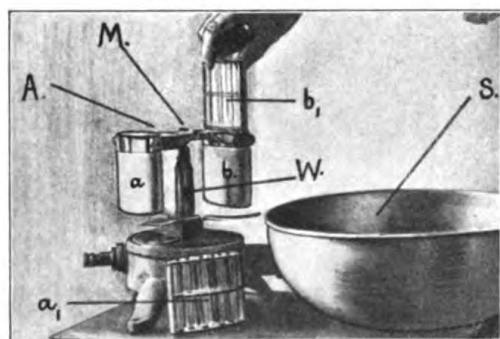


Fig. 1.

Schutzmantel *S* vorübergehend — um die Abbildung übersichtlicher zu machen — abgeschraubt ist. Verändert ist der Aufsatz *A*, der in seiner jetzigen Gestalt auf jede im Gebrauch befindliche Laboratoriumszentrifuge mit Wasser oder elektrischem Antrieb leicht aufzupassen ist. Zu dem Zweck wird von einer solchen das aus zwei oder vier Gehängen bestehende Oberteil an der senkrecht stehenden Welle *W* abgeschraubt, dafür der neue, aus starkem Nickelblech bestehende Aufsatz *A* aufgesetzt und mit der Mutterschraube *M* befestigt.

Dieser Aufsatz trägt zwei becherförmige Büchsen *a* und *b*. Der Durchschnitt einer solchen ist lang-oval. In die Büchse paßt ein Aluminiumeinsatz  $a_1$  bzw.  $b_1$ . Jeder ist zur Aufnahme von 6 Agglutinationsröhrchen bestimmt.

In der Abbildung ist der Einsatz  $a_1$  an den Fuß der Zentrifuge gestellt;  $b_1$  wird vom Untersucher in die Büchse *b* eingesetzt.

Sind die Einsätze zum Zentrifugieren in die Büchsen gebracht, so lassen sich diese durch einen Aluminiumdeckel fest verschließen.

Beim Füllen der Gläschen, die sich in den dünnen Aluminiumeinsätzen befinden, können diese leicht fallen. Das zu verhüten, bezweckt ein Stativ (Fig. 2), das, wie wir später

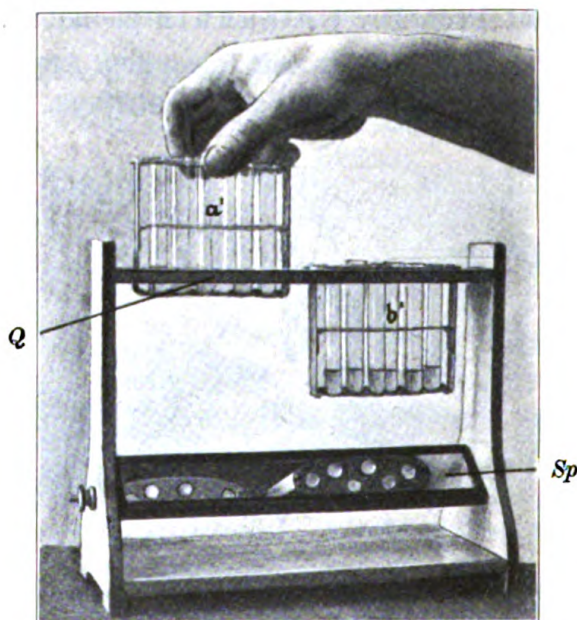


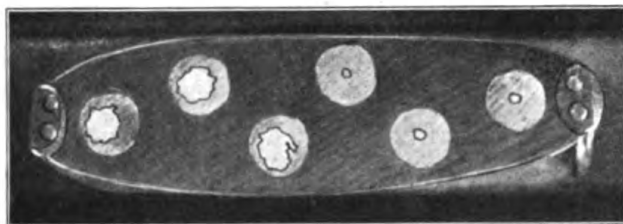
Fig. 2.

sehen werden, auch gleichzeitig dazu dient, den Bodensatz der Röhrchen nach dem Zentrifugieren zu betrachten. Es handelt sich um ein Gestell aus Ahornholz. (Das Ahornholz ist sehr hart und läßt sich daher leicht durch Waschen mit Desinfektionsmitteln desinfizieren, ohne sich zu ziehen.)

In einer oberen Querstütze  $Q$  befinden sich zwei ovale Ausschnitte, die zur Aufnahme der Einsätze  $a_1$  und  $b_1$  bestimmt sind. In der Fig. 2 hängt  $b_1$  in dem Gestell; der Untersucher ist im Begriff,  $a_1$  in dasselbe einzusetzen.

Der parallel zur oberen Querstütze unter ihr angebrachte Spiegel  $Sp$  ermöglicht es nun, bequem den Bodensatz jedes Gläschens zu betrachten, wie das die Figur mit dem Einsatz  $b_1$  zeigt.

Die typische Form des Bodensatzes nach 10 Minuten langem Zentrifugieren zeigt Fig. 3 (vgl. auch die Arbeit von Gaegtens, Arb. a. d. Kaiserl. Ges.-Amt). Es wurde hier das Spiegelbild eines Einsatzes in dem Stativ photographiert.



Röhrchen: 1 2 3 4 5 6

Fig. 3.

In den Röhrchen 1—3 fand die Agglutination statt. Der Bodensatz ist weit zerstreut, von unregelmäßiger, gezackter Gestalt. In Röhrchen 4—6 blieb die Reaktion aus; der Bodensatz ist kreisrund, knopfförmig und scharf begrenzt.

Der hier beschriebene Apparat kombiniert also die außerordentlich bequeme und zeitsparende Gaegtenssche Agglutinationstechnik mit dem Prinzip des Kuhn-Woithe'schen Sedimentoskops.

Theoretisch ist einzuwenden, daß die beiden äußersten Röhrchen eines jeden Einsatzes nicht in der radialen Richtung der Zentrifugalkraft stehen. Der Bodensatz findet sich daher nicht genau im Zentrum des Bodens. Die geringe Verschiebung nach außen ist aber praktisch belanglos. Ich konnte mich durch zahlreiche Versuche überzeugen, daß eine positive Agglutination dadurch nicht vorgetäuscht wird.

Die Anwendung des Apparates ist mit dem Beschriebenen nicht erschöpft. Die allgemein in Laboratorien gebräuchlichen Zentrifugen sind für 4 Röhrchen eingerichtet. Will man eine größere Zahl Röhrchen gleichzeitig zentrifugieren, so müssen mehrere Zentrifugen zur Verfügung stehen. Die beschriebene Einrichtung ermöglicht es, mit einer Zentrifuge gleichzeitig 12 Röhrchen zu zentrifugieren. Sie eignet sich daher gut zur Serumgewinnung aus den Blutproben, die in größerer Zahl für die Wassermannsche Reaktion, für die Agglutination und andere Zwecke eingesandt werden. Ueber die 12 Röhrchen verteilt, kann man in einem Mal 80—100 ccm mit Antiformin nach Uhlenhuth für den Tuberkelbacillennachweis homogenisierten Auswurf, Stuhl, Eiter usw., ferner größere Urinmengen, Milch u. a. zentrifugieren.

Der Deckel auf der Zentrifugenbüchse bietet beim Zentrifugieren von Rotz und anderem schwer infektiösen Material einen genügenden Schutz gegen Verschleudern desselben.

Sämtliche Teile sowohl der Zentrifuge wie des Stativs sind desinfizierbar.

Infolge der größeren Belastung läuft die Zentrifuge langsamer als bisher an; nach dem Abstellen der treibenden Kraft aber auch langsamer aus. Das sind zwei so bedeutende Vorteile, durch die eine vielleicht etwas geringere Maximalgeschwindigkeit aufgewogen wird.

Der beschriebene Apparat nebst den zugehörigen Zentrifugengläschen wird von der Firma Walb & Herlein, Straßburg i. E., Hohenlohestr., geliefert.

---

*Nachdruck verboten.*

[Mitteilung aus dem hygienisch-bakteriologischen Institut der Universität Erlangen, exp.-biologische Abteilung (Prof. Dr. Wolfgang Weichardt), und aus dem chemisch-biologischen Laboratorium der IV. Abteilung des St. Rochus-Spitals der Haupt- und Residenzstadt Budapest (Prof. Dr. Stephan v. Tóth).]

### **Versuche, Antigen- und Antikörperbeeinflussungen sichtbar zu machen.**

#### **Experimentelle Studien mit der Epiphanyreaktion.**

##### **I. Mitteilung.**

Von **Eugen Rosenthal** (Budapest).

Mit 4 Figuren im Text.

(Eingegangen bei der Redaktion am 6. März 1912.)

Nachdem das gegenseitige Verhältnis der Antigene und der Antikörper erkannt war, machte sich teils aus theoretischen, teils aus praktischen Gründen auch das Bedürfnis fühlbar, zu ihrem Nachweis im Organismus Wege und Methoden zu finden. Der erste Versuch, welcher in dieser Richtung angestellt wurde, war natürlich der Tierversuch, durch welchen gezeigt werden konnte, ob in dem fraglichen Serum Stoffe vorhanden sind, welche die toxische oder tödliche Wirkung des betreffenden Antigens aufheben können (Diphtherietoxin, Diphtherieheilserum). Dann wurde die Agglutination und Präzipitation aufgefunden. Indessen sind dies Methoden, welche sich praktisch nur für ganz spezielle Fälle bewährt und brauchbar erwiesen haben. Eine Methode, die man zum allgemeinen Nachweis von Antikörpern geeignet hielt, war das von Bordet und Gengou entdeckte Phänomen der sogenannten Komplementablenkung. Wie allgemein bekannt, wurde dieselbe von Wassermann, Neisser und Bruck für die Diagnose der Lues ausgearbeitet. Es hat sich indessen bekanntlich herausgestellt, daß die Reaktion nicht an die von der Leber luetischer Föten gewonnenen spezifischen Stoffe gebunden ist, sondern daß die Reaktion ebenso zustande kommt, wenn man als Antigen ein Extrakt vom normalen Meerschweinchenherz verwendet.

Hierdurch ging aber der Beweis der Spezifität der Komplementablenkungsmethode bei Lues verloren; denn wäre eine solche vorhanden, so könnte die Reaktion mit einem unspezifischen Antigen nicht zustande kommen. — Ich denke, es bleibt hier wohl nichts anderes übrig als zu gestehen, daß die praktische Verwertung der Komplementablenkungsmethode für die Luesdiagnose ein glücklicher Zufall ist, welcher dem Fortschritte der Wissenschaft bereits oft und mit viel Erfolg zu Hilfe kam. Es bleibt sich nun gleich, ob hier ein sensibilisierender Ambozeptor wirkt, ob eine Ablenkung, Fixierung oder gar Zerstörung des Komplementes stattfindet: ich möchte hier nur daran festhalten, daß man die Reaktion nur bei Syphilis gesetzmäßig findet, und daß sie bei anderen Infektionskrankheiten kaum und höchst unsicher vorhanden ist. Nur noch bei Typhus- und Meningokokkeninfektion ist sie regelmäßiger zu finden, fehlt dagegen oder erscheint nur ganz ungesetzmäßig bei Tuberkulose, Cholera, Gonokokken, Streptokokken, Staphylokokken, Malaria, Lepra etc. Wenn ich noch erwähne, daß z. B. die Reaktion bei Lepra nicht nur mit alkoholischem Meerschweinchenherzextrakt, sondern auch mit Tuberkulin positiv<sup>1)</sup> ist, so wird mir wohl ein jeder beistimmen müssen, daß hier von einer allgemein gültigen theoretischen Grundlage, und von einer allgemein verwertbaren Methode, welche zum Nachweis von Antikörpern geeignet wäre, nicht die Rede sein kann, und daß dieselbe nur für die Syphilisdiagnose praktisch verwendbar ist. — Schließlich ist die anaphylaktische Reaktion zu erwähnen. Zum Antikörpernachweis eignet sie sich nur in manchen Fällen (besonders für Eiweißdifferenzierungen). Abgesehen davon, daß man oft erst nach Wochen zu einem Resultat kommt, scheint ihr Ausfall von so zahlreichen Komponenten beeinflusst zu sein, daß sie außer der bereits erwähnten Differenzierung von Eiweißarten keine weitere praktische Verwendung fand.

---

1) Slatinéanu (Compt. rend. Soc. Biol., 1908) möchte dies ganz merkwürdigerweise darauf zurückführen, daß die meisten Leprösen gleichzeitig tuberkulös sind: erstens ist dies nicht bewiesen, zweitens ist die Komplementablenkungsreaktion bei Tuberkulose recht unsicher. (Bei Much und Hoesli [Brauers Beitr., Bd. 17] reagierten z. B. von 9 Tuberkulösen nur 2 positiv.)



Bereits aus dieser kurzen Uebersicht kann man ersehen, daß die erwähnten Methoden zum Nachweis von Antigen-Antikörperreaktionen nur in ganz speziellen Fällen verwendbar sind, und daß ihnen durchaus keine allgemeine Gültigkeit zuzusprechen ist.

Daß sich alle Immunitätsstudien so ungeheuer kompliziert und verwickelt gestalten, daran dürfte wohl die Hauptschuld der Umstand tragen, daß man fortwährend mit unbekannten Substanzen, mit unbekannten Größen arbeiten muß. Die chemische Konstitution der Reaktionskörper, des Indikators, kennen wir nicht, ebenso ist uns ihre Wirkungsweise unbekannt. Ein besonderer Fortschritt war es nun, als Weichardt anstatt der unbekannten biologischen Indikatoren (hämolytisches System, anaphylaktischer Reaktionskörper etc.) einen gut definierten physikalisch-chemischen Indikator einschaltete, um die Antigen-Antikörperreaktionen sichtbar zu machen. Die diesbezüglichen Versuche gehen auf das Jahr 1908 zurück.

Zuerst konnte auf Glasplatten mit Millimeterteilung gezeigt werden, daß die Diffusion verschieden gefärbter Flüssigkeiten gegeneinander sich ändert, wenn der einen Antigen und der anderen der spezifische Antikörper zugemischt werden. Dasselbe Resultat ergaben die Versuche, als sie mit Kapillaren wiederholt wurden.

Ferner war Weichardt imstande, auch mittels der chemischen Wage darzutun, daß Diffusionsbeschleunigung bei Antigen-Antikörperbindung eintritt (s. Bd. 6, H. 4 d. Z., p. 645).

Schließlich konnte die Diffusionsbeschleunigung direkt durch den Weichardtschen Diffusiometer gezeigt werden.

Derselbe besteht aus zwei gläsernen wagerecht stehenden Schenkeln, welche durch ein Mittelstück mit drehbarem Glashahn verbunden sind. In der weiten Bohrung des Glashahnes ist Wasser, in dem einen Schenkel eine etwas alkalisch gehaltene Flüssigkeit, in dem anderen eine schwach saure; beide sind mit Phenolphthalein versetzt. Wird nun der Hahn geöffnet, so tritt an beiden Seiten Entfärbung ein.

Der zeitliche Verlauf dieser Entfärbung ändert sich, wenn auf der einen Seite Antigen, auf der anderen dessen spezifischer Antikörper zugemischt worden ist. Daß derartige Diffusionsvorgänge auch im Körper eine Rolle spielen, konnte

Kraus zeigen. Seine auf zahlreiche Versuche gestützten Anschauungen gipfeln darin, daß Toxin aus dem Innern der Zellen zu dem in den Körpersäften kreisenden Antitoxin hindiffundiert. Alle diese Veränderungen sind natürlich sehr fein und können nur mit den soeben beschriebenen exakten Methoden sicher nachgewiesen werden. Weniger auffällige Ausschläge sind mit dem Stalagmometer zu erhalten, mit welchem später (1910) Ascoli arbeitete.

Als sich durch alle diese Versuche herausgestellt hatte, daß jene Veränderungen gewisser physikalisch-chemischer Konstanten bei Antigen-Antikörperreaktionen gesetzmäßig vorhanden sind, galt es, eine Methodik zu finden, welche quantitatives Arbeiten gestattet. Nach vielfachen Versuchen konnte Weichardt feststellen, daß ein in der Oberflächenbildung begriffenes System durch die Antigen-Antikörperbindung beeinflussbar ist, und daß durch sie der Umschlagspunkt des beim Versuch eingeschalteten Indikators, des Phenolphthaleins, verschoben wird. Dies ist das Prinzip der Epiphaninreaktion (von ἐπιφάνεια = Oberfläche).

Diese wird in der Weise ausgeführt, daß man ein aufeinander eingestelltes  $\text{Ba(OH)}_2$ - $\text{H}_2\text{SO}_4$ -System einmal bestimmten Verdünnungen von Antigen und Antiserum zufügt, nachdem dieselben aufeinander eingewirkt haben (1. Gefäß) und in einem zweiten Fall, wo eine gegenseitige Einwirkung von Antigen und Antiserum noch nicht stattfand (2. Gefäß). Fügen wir nun Phenolphthalein hinzu, so zeigt sich, daß, wenn der betreffende spezifische Antikörper vorhanden ist, bei einer bestimmten Verdünnung desselben der Umschlagspunkt im 2. Gefäß, der Kontrolle, noch nicht eintritt, wenn er im 1. Gefäß bereits zu sehen ist. Dieser Unterschied kann durch  $\frac{n}{1000}$ - $\text{H}_2\text{SO}_4$ -Lösung ausgeglichen werden, und die Menge dieser Lösung, welche dazu nötig ist, um in beiden Gefäßen den gleichen Farbenton zu erhalten, gibt den Ausschlag des Versuches. In genau derselben Weise wird die Reaktion mit 3 verschiedenen Serumverdünnungen ausgeführt, woraus sich eine Kurve ergibt. Der Verlauf der Kurve zeigt dann den positiven oder negativen Ausfall der Reaktion an<sup>1)</sup>.

Aus dem Gesagten läßt sich jetzt schon der Schluß ziehen, daß bei Antigen-Antikörperreaktionen Veränderungen der Diffusionsgeschwindigkeit vorkommen. Es müssen also zunächst

---

1) Diese kurze Skizzierung der Epiphaninreaktion möchte ich nur zum besseren Verständnis meiner folgenden Ausführungen vorausschicken; über genauere technische Vorschriften s. weiter unten.



Veränderungen des osmotischen Druckes vorhanden sein. Damit ändern sich auch eine Reihe weiterer physikalisch-chemischer Faktoren. Bei der Epiphaninreaktion haben wir es nach unseren Beobachtungen offenbar mit Adsorptionserscheinungen zu tun, wie sie ähnlich von H. E. Wohlers bei anorganischen Salzen beobachtet wurden.

Immerhin wird es noch geraume Zeit und vieler Untersuchungen bedürfen, ehe wir über den Mechanismus und die Entstehung der Reaktion genau orientiert sind. Die für die Medizin wichtigste Frage war zunächst die, ob die Reaktion konstant ist und ob mit ihr überhaupt Serumveränderungen, wie sie durch Immunitätsvorgänge zustande kommen, meßbar sind.

Zu diesem Zwecke arbeitete Weichardt die oben kurz beschriebene Technik der Epiphaninreaktion aus, welche übrigens, wie wir weiter unten sehen werden, einen gewissen Sinn für chemisch-analytisches Arbeiten voraussetzt und nur in der Hand eines gewandten und genauen Experimentators verläßliche Ergebnisse liefert. Präzise und exakte Methoden sind aber durchaus nicht geeignet, um gewisse Dinge in weitere Kreise zu verbreiten, da wohl sehr viele Mediziner das für die Ausführung der Reaktion unbedingt nötige exakte und präzise Arbeiten nicht zustande bringen und Mißerfolge nie durch ungenaues Arbeiten erklärt, sondern stets auf die Methode geschoben werden. Aus diesem Grunde meinte auch Weichardt in einer seiner jüngsten Veröffentlichungen über diesen Gegenstand, daß die Epiphaninreaktion in ihrer heutigen Form für praktische Zwecke noch nicht verwendbar ist.

Nun gelang es mir, zur Ausführung der Epiphaninreaktion eine Methodik auszuarbeiten, welche ein jeder leicht und rasch erlernen kann, welche ganz minimale chemische Vorbildung voraussetzt und durch welche die oben erwähnte analytische Genauigkeit ausgeschaltet wird, so daß schließlich ein bedeutend rascheres und zuverlässigeres Arbeiten möglich wird. Ich glaube, daß nunmehr die Epiphaninreaktion nicht nur von einzelnen erlernt werden wird, sondern daß für sie durch diese einfache und durchsichtige Methodik die Möglichkeit gegeben ist, zum Gemeingut der weitesten Kreise zu werden.

Um auf diese Weise einer praktischen Verwertung dieser neuen biologischen Methode eine Grundlage zu schaffen, habe

ich bei einer Anzahl praktisch wichtiger Antigene die Reaktion im Tierversuch erprobt, um zu sehen, ob und unter welchen Umständen bei gewissen Erkrankungen die Epiphaninreaktion verwertet werden könnte<sup>1)</sup>. — Diese „Experimentellen Studien“, welche ich teilweise in Gemeinschaft mit dem gewandten Mitarbeiter Prof. Weichardts, Herrn Dr. Stötter, auszuführen Gelegenheit hatte, sollen nun in einer Reihe von Mitteilungen veröffentlicht werden. Dieselben erstrecken sich vor allem auf Diphtherie, Tuberkulose, dann auf Infektionen mit Streptokokken, Staphylokokken, Gonokokken, auf Differenzierung verschiedener Körpereiwieße, ferner auf die Frage der Spezifität und der Inaktivierung usw. Zuvor ist es indessen nötig, auf einige Dinge von allgemeiner Wichtigkeit (Eigenschaften des Antigens, des Antiserums), sowie auf die Technik der Reaktion näher einzugehen.

---

Ueber das Antigen. Für das Gelingen unserer Reaktion ist von besonderer Wichtigkeit, zur Reaktion stets ein entsprechendes Antigen zu verwenden. So darf man z. B. bei Ausführung der Epiphaninreaktion bei Tuberkulose nur ein geeignetes Tuberkulin verwenden, da man sonst zu keinem sicheren Resultat kommt. Das Antigen muß für unsere Reaktion stets in jener Verdünnung zum Versuch herangezogen werden, welche mit dem wenigstens 48 Stunden alten, mit etwas Karbol versetzten, genügend verdünnten Serum eines gesunden Meerschweinchens keinen Ausschlag gibt. (Ein solches Serum möchte ich für unseren Versuch als ein „Standardserum“ bezeichnen.) Ist die richtige Antigenverdünnung einmal festgestellt, so wird man sie in der Regel zur Reaktion beibehalten können. Wir verwenden gewöhnlich Antigene, welche in einer Verdünnung von  $10^{-2}$  unter Antikentoxinzusatz (siehe weiter unten) mit dem Standardserum keinen Ausschlag geben. Dieser Forderung entsprachen z. B. die Normalgiftlösung Behrings bei Diphtherie, Aufschwemmungen von abgetöteten Streptokokken im Verhältnis von

---

1) Erst auf Grund zahlreicher Versuche kann von einer praktisch-diagnostischen Verwertung unserer Reaktion die Rede sein.

1:10 ccm 20-proz. Glycerinwasser. Nach der Erfahrung von Weichardt und Stötter eignet sich das 20-proz. Glycerinwasser ganz vorzüglich zur Herstellung der Antigene; dieselben sind ohne jeden Zusatz sehr gut haltbar, scheinen ihren Titer nicht zu verändern und haben sich in jeder Hinsicht bewährt. Während ihrer Versuche haben indessen die beiden Autoren gefunden, daß man mit gewissen Antigenen nur dann richtige Resultate erhält, wenn man denselben eine Spur von Antikenotoxin zusetzt. Der Mechanismus der Wirkung liegt nach der Ansicht Weichardts in einer partiellen Absättigung gemeinsamer Eiweißspaltprodukte, die wie in dem bekannten Castellanischem Versuch vorher abgebunden werden und dann nicht mehr sichtbar in Reaktion treten. Jedenfalls pflegt die Epiphaninreaktion danach spezifischer auszufallen.

Das Antikenotoxin kann von der Chem. Fabrik A. G. Kalle in Biebrich a/Rh. bezogen werden und wird in einer Verdünnung von  $10^{-4}$  verwendet. Von der Fabrik wird das Präparat unter dem Handelsnamen „Retardin“ in den Verkehr gebracht. Von demselben bereitet man sich eine Stammlösung 1:10, von welcher man beim Versuch zuerst eine Verdünnung 1:100 (= 0,1:10), dann von dieser eine von 1:10 herstellt. Diese letzte Verdünnung ist gleich  $10^{-4}$  des unverdünnten Präparates und von dieser wird bei Anstellung der Reaktion dem Antigen 0,1 ccm zugefügt<sup>1)</sup>. Da man bei Verwendung eines Antigens zunächst nicht weiß, ob es nicht Eiweißspaltprodukte enthält, die eventuell Verwandtschaftsreaktionen auslösen, soll es zur Regel gemacht werden, zu jedem Antigen gleichsam prophylaktisch in der angegebenen Weise Antikenotoxin zuzusetzen.

Die Sera dürfen in der Regel nicht frisch untersucht werden; denn nach unserer Erfahrung befinden sich in frischen Seren Stoffe, welche unsere Reaktion störend beeinflussen können, indem sie zuweilen ganz enorme und unkonstante Ausschläge veranlassen. Wenn man die abgehobenen Sera mit etwas Karbol versetzt und dieselben dann 2 Tage lang im Eisschrank aufbewahrt, so werden in der Regel diese störenden Substanzen vernichtet. Gewöhnlich untersucht man die Ausschläge für Verdünnung  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$  und  $10^{-8}$ . Bei den von uns untersuchten Antigenen (s. unten) lag

1) Nach dem Abmessen von Antikenotoxin sind die Pipetten durch mehrfaches (2—3maliges) Spülen gründlich zu reinigen!

für Diphtherie der Maximalwert bei den Serumverdünnungen  $10^{-4}$ , bei Tuberkulose und in zahlreichen anderen Fällen bei der Serumverdünnung  $10^{-6}$ .

Nimmt man Verdünnungen des Serums unter  $10^{-3}$ , so sind die störenden Stoffe noch nicht genügend verdünnt und man bekommt unsichere Resultate, wie dies auch die Versuche von Kamman<sup>1)</sup> beweisen. Verdünnt man dagegen das Serum über  $10^{-8}$  hinaus, so nähern sich die Werte allmählich der Nullinie, fallen eventuell auch unter diese<sup>2)</sup>. Im Falle einer positiven Reaktion nimmt die Kurve einen Verlauf, welcher einen bedeutenden positiven Ausschlag zeitigt, worauf kleinere, um die Nullinie schwankende, pendelartige Ausschläge folgen, welche andeuten, daß zwischen Antigen und Serum neben der erheblicheren spezifischen Reaktion auch bei sehr hohen Verdünnungen noch feinste chemisch-physikalische Aenderungen ablaufen.

Ueber die Technik der Epiphaninreaktion mit der von Weichardt angegebenen Originalmethode nebst einigen weiteren Verfeinerungen derselben berichtete jüngst Stötter<sup>3)</sup>. In dieser Arbeit ist die Ausführung der Epiphaninreaktion mittels der Mikrapipette ganz genau beschrieben. In derselben sind alle Einzelheiten angeführt, mit allen möglichen Fehlerquellen, welche in Betracht kommen können. Es wird auch angegeben, wie diese sicher zu umgehen sind. Eine nochmalige genaue Angabe aller dieser wichtigen Details ist daher überflüssig, und ich führe diese Weichardt-Stötter'sche Ausführungsweise der Epiphaninreaktion nur so kurz an,

1) Kamman, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 11, p. 178.

2) Die Herstellung der Verdünnungen des Antikentoxins, des Antigens und des Serums geschieht am einfachsten in einer Reihe von Meßröhrchen (mit Glasstöpsel), welche ungefähr 15 ccm fassen. In dieselbe wird je 10 ccm destilliertes Wasser abgemessen; von dieser entnimmt man soviel mit einer Mikrapipette, wieviel die zu verdünnende Flüssigkeit beträgt und schüttelt nach Verschuß mit dem Glasstöpsel gründlich durch. (Verdünnung  $10^{-2}$  bekommt man, wenn man 0,1 : 10 verdünnt;  $10^{-4}$ , wenn man von der so erhaltenen Lösung wieder 0,1 : 10 verdünnt;  $10^{-6}$  wieder durch Verdünnung von 0,1 ccm der Lösung  $10^{-4}$  zu 10 ccm destilliertem Wasser usw.)

3) H. Stötter, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 11, p. 749.

als dies zum Verständnis meiner weiteren Ausführungen unbedingt nötig ist, und gehe auf Einzelheiten nur dort ein, wo diese in der Arbeit von Stötter aus äußeren Gründen keine Erwähnung fanden.

Beim sogenannten Viergläser-Versuch wird zuerst die Kurve für die Verdünnung  $10^{-8}$  bestimmt<sup>1)</sup>: die 4 Gläser werden zuerst mit Antigen, Antiserum bzw. Wasser in der Weise beschickt, wie dies am folgenden Schema verzeichnet ist:

I	II	III	IV
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Phenolphth. mit SrCl <sub>2</sub>	Phenolphth. mit SrCl <sub>2</sub>	Phenolphth. mit SrCl <sub>2</sub>	Phenolphth. mit SrCl <sub>2</sub>
Ba(OH) <sub>2</sub>	Ba(OH) <sub>2</sub>	Ba(OH) <sub>2</sub>	Ba(OH) <sub>2</sub>
Antiserum	Wasser	Antiserum	Wasser
Antigen	Antigen	Wasser	Wasser

Nachher werden die Flüssigkeiten durch leichtes Schwenken der Gläser vermischt und 10—15 Minuten stehen gelassen. Nun folgt der wichtigste und schwierigste Teil des Versuches, das Einfüllen des Indikatorsystems. Dasselbe besteht aus gleichen Mengen (3 ccm) auf die verwendete Barytlösung womöglich genau eingestellter Schwefelsäure und der Barytlauge nebst Phenolphthaleinzusatz. Bei der Beschickung der Gläser verwende man stets eine bestimmte Pipette für Barytlauge und eine andere für die Schwefelsäure. Zuerst füllt man die Barytlauge ein, indem man das Meßröhrchen mit derselben zweimal füllt und ausspült; die zum dritten Male genommene Menge wird erst zum Versuch verwendet und in das betreffende Glas abgefüllt. Um jede Spur Lauge von der Pipette herauszubekommen, muß dieselbe in der von Stötter beschriebenen Weise zweimal mit destilliertem Wasser nachgespült werden (vom Spülgefäß 1 in das Spülgefäß 2). Natürlich muß man dabei darauf achten, daß vom Spülwasser nichts überläuft; also stets nur ungefähr  $\frac{7}{8}$  der Meßröhre mit Spülwasser füllen! Ferner muß man beim Holen des Spülwassers stets vorerst ansaugen und währenddem die Pipette in das

1) Man beginne stets mit der höchsten Verdünnung, da diese am wenigsten haltbar ist.

Wasser eintauchen, damit keine Lauge in das Wasser diffundiert. Dann wird das zweite und alle weiteren Gläser in der soeben beschriebenen Weise mit Barytlauge gefüllt. Hat man 1 oder 2 Kurven bestimmt, so empfiehlt es sich, die Barytpipetten mit Salzsäure zu reinigen, um die Wand derselben vom entstandenen Barytkarbonat zu befreien, da dieses die Meßröhre allmählich verstopft (besonders an der feinen oberen Auslaufstelle) und da durch dieselbe die Betrachtung der Flüssigkeitshöhe im oberen Teil der Meßröhre erschwert ist. (Nach der Salzsäure ist das Röhrchen natürlich mit destilliertem Wasser sorgfältig auszuspülen.) Dann folgt der Phenolphthaleinzusatz und schließlich wird in jedes Glas dieselbe Menge Schwefelsäure abgemessen. Hierbei hat man natürlich mit derselben Vorsicht und Genauigkeit vorzugehen, wie bei dem Abmessen der Barytlauge.

Bei der Einfüllung der Lauge und der Säure hat man ferner auf folgende Punkte genau zu achten:

1) soll man das Meßröhrchen in die Säure bzw. Lauge gleichmäßig tief eintauchen und die untere Spitze am Hals der Flasche abstreifen: unterläßt man dies, so bleibt — je nachdem man mehr oder weniger tief eintaucht — ein kleinerer oder größerer Tropfen hängen;

2) muß darauf streng geachtet werden, daß man die Meßröhrchen vollständig fülle und wenn sie einmal gefüllt sind, muß der Stempel fest und sicher gehalten werden, damit oben keine Luft eintrete. Ebenso darf man den Stempel nicht mehr anziehen, wenn die untere Spitze der Pipette bereits aus der Flüssigkeit heraus ist, denn in diesem Fall tritt wieder unten Luft ein. Natürlich darf auch im Innern der Röhre keine Luft vorhanden sein, da eine solche einen ganz groben Fehler bedingt.

Sind nun alle vier Gläser mit den betreffenden Flüssigkeiten genau gefüllt, so wird der Inhalt von Gefäß I und IV einerseits und II und III andererseits nebst dem Inhalt der Spülgefäße<sup>1)</sup> zusammengegossen und sorgfältig nachgespült<sup>2)</sup>.

1) Gefäß I und IV haben gemeinsame Spülgefäße, ebenso Gefäß II und III (vgl. Stötter l. c.).

2) Neuerdings fügen wir den Indikator erst am Schluß, nachdem I und IV und II und III vereinigt worden sind, zu. Es werden dadurch 2 Pipettierungen erspart.

Wenn die Baryt- und die Säurelösungen aufeinander ganz genau eingestellt sind, dann ist die Reaktion ohne weiteres zu sehen. Dies ist indessen selten der Fall, denn meistens ist die Säure etwas stärker als die Lauge, und man muß gewöhnlich 2—3, oder ausnahmsweise noch mehr Kubikzentimeter  $n_{100}$ -Natronlauge<sup>1)</sup> eventuell aber auch Säure beiden Lösungen zufügen, bis in einem Glas die Uebergangsfarbe und im andern Glas (im Falle eines Ausschlages) ein etwas stärkeres Rot des Phenolphthaleins erscheint. Nun werden dem letzteren Glas so viel Kubikzentimeter einer  $n_{1000}$ -H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung zugefügt, bis in demselben derselbe Uebergangston des Phenolphthaleins zu beobachten ist, wie im nebenstehenden andern Glas. War hierbei die stärkere Färbung im II. Gefäß (entstanden aus dem Inhalt von II und III) vorhanden, so ist der Ausschlag positiv und wird in unserem Ordinatensystem zur betreffenden Serumverdünnung über die Nulllinie eingetragen, ist dagegen der Inhalt vom Glas I stärker rot, so ist der erhaltene Wert negativ. Wenn kein Ausschlag vorhanden ist, so ist ein Farbenunterschied zwischen beiden Gläsern nach Hinzufügung von NaOH natürlich nicht zu finden.

In der soeben beschriebenen Weise werden die Werte für 3 Verdünnungen festgestellt, dieselbe in unsere Tabelle eingetragen, wodurch man dann einen bestimmten Kurvenverlauf bekommt, welcher je nach dem positiven oder negativen Ausfall der Reaktion verschieden ist.

Arbeitet man ganz genau nach den von Weichardt und Stötter angegebenen Vorschriften und berücksichtigt man die soeben angegebenen Details, so bekommt man stets sichere, verlässliche Werte, so daß man bei Parallelbestimmungen keine größeren Abweichungen bekommt, als die Fehlergrenze beträgt [dieselbe macht bei einiger Uebung nicht mehr als ungefähr  $\pm 1$  ccm aus<sup>2)</sup>]. Aber wie bereits erwähnt, ist dabei ein absolut exaktes Arbeiten und ein gewisser Sinn für chemisch-analytische Genauigkeit unerlässlich, denn fehlt z. B. letzterer, so werden Fehler vom Experimentator vollständig übersehen.

1) Einmal mit NaOH vorspülen, einmal mit destilliertem Wasser in das Glas nachspülen.

2) Ueber nähere Details bezüglich der Fehlergrenze soll in der nächsten Mitteilung berichtet werden.

Wir waren uns bewußt, daß die Ausführung der Epi-  
phaninreaktion im gewöhnlichen Laboratorium auf Schwierig-  
keiten stoßen würde, da man im allgemeinen die einfache

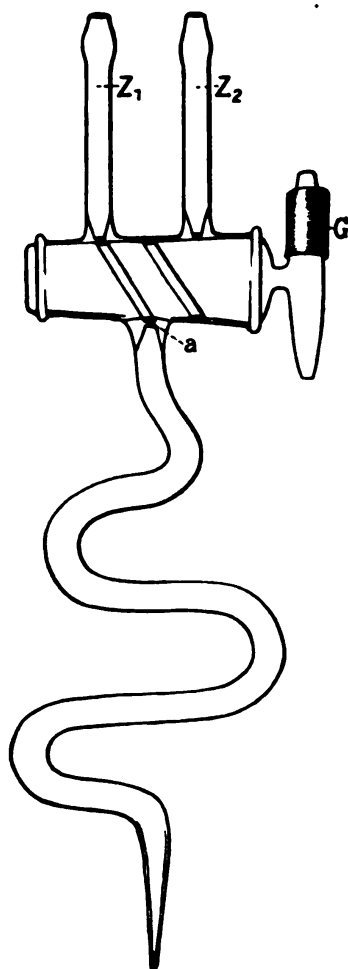


Fig. 1.  $Z_1$  Zulaufrohr für Baryt bzw. Säure.  $Z_2$  Zulauf-  
rohr für destilliertes Wasser.  $G$  ein über denjenigen Teil des  
Hahnes gezogenes Gummi-  
schlauchstück, welches bei der  
Hahnstellung für Lauge bzw.  
Säure stets oben und bei  
Einstellung auf destilliertes  
Wasser stets unten ist.

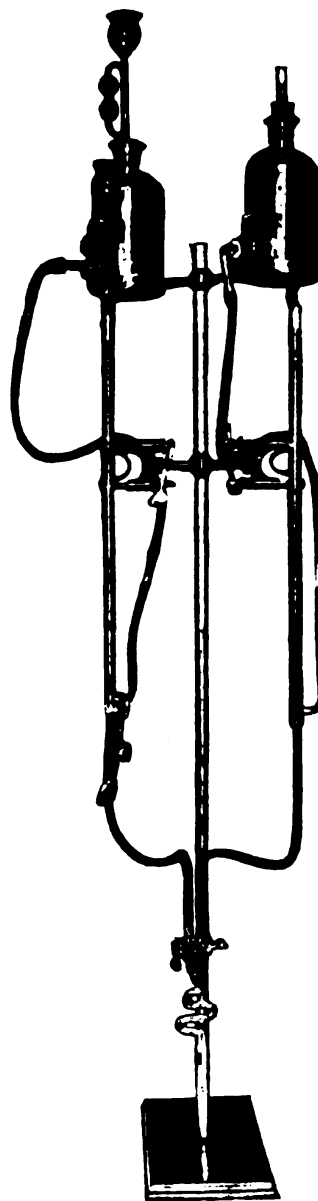


Fig. 2.

Bedingung eines ganz präzisen Arbeitens leider nur sehr selten  
erfüllt wissen kann. Deshalb habe ich versucht, eine Ver-  
suchseinrichtung zu finden, welche ein genaues Arbeiten ge-



stattet, aber dabei das mühsame, peinliche, genaue und verhältnismäßig viel Zeit absorbierende Arbeiten des Abmessens von Alkali und Säure mit der Mikrapipette vermeiden läßt. Dies ist mir geglückt, indem ich zum Abmessen der Barytlauge bzw. der Schwefelsäure eine spiralig verlaufende Pipette — Spiralphpipette — verwende, wie sie in Fig. 1 zu sehen ist<sup>1)</sup>. Die Spirale faßt von „a“ bis zur Spitze ungefähr 3 ccm und kann durch verschiedene Einstellung des doppelt durchbohrten Glashahnes mit einer der beiden Zulaufrohren verbunden werden, während ein Zufluß vom anderen Rohr unmöglich ist. — Für Lauge und Säure verwende man je eine Spiralphpipette, und zwar in der Weise, daß bei der Barytpipette durch das Zulaufrohr 1 die Barytlauge, bei der Säurepipette Schwefelsäure zuläuft, während durch das Zulaufrohr 2 in beiden Fällen destilliertes Wasser zugeleitet wird. Die Zulaufrohren sind mit Büretten verbunden, welche von Devilleschen Flaschen automatisch gefüllt werden können (siehe Fig. 2). Das Prinzip dieses Apparates besteht nun in folgendem: wenn man durch die Spirale vom Zulaufrohr 1 solange Barytlauge fließen läßt, bis dieselbe den Inhalt derselben (destilliertes Wasser) vollkommen verdrängt, so daß in der Spirale die unverdünnte Barytlauge des Zuflußrohres vorhanden ist, so hat man nach Verschuß des Glashahnes eine abgemessene Menge von Barytlauge vor sich: beträgt der Inhalt der Spirale von der Einmündungsstelle „a“ bis zur unteren Spitze 3 ccm, so hat man eben diese Menge abgemessen in der Hand<sup>2)</sup>. Diese bestimmte Menge kann man nun dadurch aus der Spirale quantitativ herausbekommen, daß man durch das Zuflußrohr 2 solange destilliertes Wasser durch die Pipette leitet, bis das herausfließende Wasser mit Phenolphthalein nicht die geringste Spur von Rötung zeigt.

Die in diesem Sinn ausgeführten Versuche haben gezeigt, daß, wenn die Spirale mit Barytlauge gefüllt ist, man dieselbe durch ein Nachspülen von 14 ccm destillierten Wassers

1) Dieselbe wird von der Firma F. & M. Lautenschläger erzeugt und kann von derselben bezogen werden.

2) Für physikalisch-chemische und für unsere Zwecke kommt es nicht auf die absolute Menge der verwendeten Lösungen an, dieselbe kann 2.8 wie auch 3.2 betragen, sondern darauf, daß stets, wenigstens aber innerhalb eines Versuches, gleiche Mengen verwendet werden.

vollkommen herausbekommt, denn das über diese Menge gelassene Wasser zeigt auf Zusatz von Phenolphthalein keine Rötung mehr. Wenn man anstatt einer spiralig verlaufenden Pipette eine gerade Pipette verwendet, so braucht man zum vollständigen Ausspülen der Lauge nicht 14, sondern 20—22 ccm Spülwasser, was natürlich die Ausführung der Reaktion recht unbequem gestalten würde. Durch den spiraligen Verlauf der Pipette ist ein rasches und gründliches Abspülen der Pipettenwand mit wenig Spülwasser gesichert, denn durch die fortwährenden Windungen des Rohres werden die an die Pipettenwand anschlagenden Flüssigkeitsteile stets auf eine gegenüberliegende Wand reflektiert, wodurch dann diese auch von den letzten Spuren von Baryt z. B. sehr rasch, gründlich und mit wenig Spülwasser befreit werden. — Zur vollkommenen Fällung der Spirale mit Baryt genügen etwa 13—14 ccm, um aber einen Fehler sicher zu vermeiden, soll man stets 15 ccm Barytlauge abfließen lassen. Wenn man größere Mengen von Baryt, 30—40 ccm, durch die Spirale leitet, findet man, daß die dann herausgespülte Lauge mit genau derselben Menge von Säure neutralisiert wird, als wenn man mit 15 ccm „vorspült“. Hieraus ergibt sich, daß sich in der Spirale die unverdünnte Barytlauge des Zuflußrohres befindet, wenn man 15 ccm von derselben ablaufen läßt. Die zum Nachspülen verwendeten 14 ccm destillierten Wassers werden nun in der Weise verteilt, daß man davon 4 ccm in ein Gefäß des Viergläserversuches und 10 ccm in das Spülgefäß ablaufen läßt. Es empfiehlt sich ungefähr bei 2 ccm vor dem Abfließen der gesamten Spülflüssigkeit den Hahn für einen Moment zu schließen. Die Beschickung der Gefäße I—IV eines Viergläserversuches gestaltet sich also folgendermaßen:

1) Man läßt 15 ccm Baryt in ein indifferentes Gefäß abfließen; etwa an der Spitze der Spiralpipette hängende Tropfen werden abgewischt.

2) Der Hahn wird um  $180^\circ$  gedreht und durch 4 ccm destilliertes Wasser spült man die abgemessene Lauge in Glas I.

3) Man läßt  $8 + 2$  ccm destilliertes Wasser in das gemeinsame Spülgefäß für Glas I und IV abfließen.

Nun ist Glas I mit Baryt gefüllt; Glas II füllt man in derselben Weise, man beginnt mit dem „Vorspülen“ mit 15 ccm

Baryt und fährt so fort, wie soeben beschrieben, mit dem Unterschied, daß das Spülwasser in das gemeinsame Spülgefäß von II und III hinabgelassen wird. Glas III und IV werden in analoger Weise gefüllt. Dann folgt der Phenolphthaleinzusatz und schließlich kommt die Schwefelsäure, welche man genau in derselben, soeben für Baryt beschriebenen Weise mit einer zweiten Spiralpipette in die betreffenden Gläser abfüllt <sup>1)</sup>.

Bereits aus dieser Darstellung dürfte wohl ein jeder die Ueberzeugung gewinnen, daß die Spiralpipette eine entschieden einfachere, raschere Ausführung der Epiphaninreaktion gestattet und daß durch dieselbe das ungenaue Arbeiten, welches eine weitere Verbreitung dieser Methode beinahe ganz unmöglich machte, einfach ausgeschaltet ist. Bei Ausführung der Epiphaninreaktion mit der Spiralpipette kommt es doch nicht darauf an, ob man aus der Bürette um einige Zehntel Kubikzentimeter mehr oder weniger ablaufen läßt; das zuweilen ermüdende „Vorspülen“ und „Nachspülen“ mit der Mikra wird durch eine einfache Drehung des Glashahnes ersetzt. Eine ungenaue Füllung der Pipette ist ausgeschlossen, Luftblasen können in dieselbe überhaupt nicht eindringen (hierüber siehe auch weiter unten), ein Niederschlag von Barytkarbonat ist ebenfalls unmöglich, da, wie wir sehen werden, die Füllung der Bürette unter Kohlensäureausschluß erfolgt. (Demnach fällt auch die Reinigung der Meßröhre mit HCl fort.) Wie wir weiter oben gesehen haben, beansprucht das Nachspülen der Mikra mit destilliertem Wasser insofern eine besondere Aufmerksamkeit, daß man beim Eintauchen in das Wasser sofort ansauge, ferner, daß man nur bis ungefähr  $\frac{7}{8}$  des Meßröhrchens die Lauge bzw. die Säure ausspüle, da man sonst Gefahr läuft, von der Spülflüssigkeit etwas überlaufen zu lassen. Um alle diese Dinge braucht man sich hier nicht zu kümmern, da bei Anwendung des Apparates von diesen Fehlerquellen keine Rede sein kann. — Die Manipulationen mit dem Doppelhahn dürften auch den in chemischer Hinsicht weniger Geübten keine ernststen Schwierigkeiten bereiten, und wenn ich noch erwähne, daß man mit einiger Uebung eine vollständige Be-

1) Es ist zweckmäßig, an den Schwefelsäure- und Barytbüretten jeden 15. und an der Wasserbürette jeden 4. und 10. ccm mit einem Dermographenstrich auffallend zu machen.

stimmung mit 3 Werten in ungefähr 50 Minuten fertig hat — gegenüber den  $1\frac{3}{4}$  Stunden der Originalmethode — so kann man über die ganz besonderen Vorteile, welche die Spiralpipette bietet, keine Zweifel haben.

Im übrigen ist die Reaktion wie gewöhnlich auszuführen.

Ueber die Zusammenstellung und Füllung des Apparates möchte ich noch einiges bemerken.

Zur Zusammenstellung braucht man 4 automatisch von unten nachfüllbare Büretten und 4 Devillesche Flaschen, wenn man den Apparat in der Weise zusammenstellt, wie in Figur 1 angegeben. Von den Büretten werden je 2 für den Laugenapparat bzw. für den Säureapparat verwendet. Jede Bürette wird einmal mit einem Zuflußrohr einer Spiralpipette und dann mit der betreffenden Devilleflasche mittels Gummiröhren verbunden. Letztere sind durch Quetschhähne verschließbar. Die Devilleflasche, welche für die Lauge bestimmt ist, wird mit destilliertem Wasser gefüllt; dann wird ihre obere Oeffnung in der Weise verschlossen, daß die Luft in die Flasche nur durch KOH oder KOH und Chlorcalcium in dieselbe gelangen kann: kurz, der Inhalt der Flasche muß vor Kohlensäure geschützt sein. Nun läßt man das vorhin in die Flasche gefüllte destillierte Wasser an der unteren Oeffnung der Flasche durch ein Gummirohr ausfließen, wodurch dieselbe mit kohlensäurefreier Luft gefüllt wird. Den Eintritt der Luft von unten verhindert inzwischen der am Gummirohr angebrachte Quetschhahn. Dieses Gummirohr wird nun mit der bereits filtrierte Barytlösung mit Hilfe eines geeigneten Glasrohres in Verbindung gebracht, wodurch dann die Barytlauge ganz kohlensäurefrei in die betreffende Flasche übergeleitet werden kann. Die Barytbürette wird in ganz analoger Weise gefüllt; die beim Herablassen der Flüssigkeit in die Bürette eintretende Luft muß ein mit Kalilauge gefülltes Sicherheitsventil passieren, wodurch die Bildung von Barytkarbonat innerhalb der Bürette ausgeschlossen ist.

Bei der Zusammenstellung des Apparates ist der Füllung der Spiralpipette eine besondere Sorgfalt zuzuwenden, denn diese darf natürlich absolut keine Luftblasen enthalten. Dies wäre ein ebenso großer Fehler, als möchte man eine Luftblase bei der Verwendung der Mikrapipette übersehen. Eine ge-

naue Füllung der Pipette unter vollkommener Vermeidung von Luftblasen kann in folgender Weise leicht ausgeführt werden: die untere Spitze der Spiralphpipette wird etwa 2 cm tief in destilliertes Wasser getaucht, währenddem man bei entsprechender Einstellung des Glashahnes zuerst an einem, dann am andern Zuflußrohr ansaugt und das Wasser wieder auslaufen läßt; dies wird einige Mal wiederholt — um auch die kleinsten Luftblasen von der Wand der Pipette wegzubringen — und nun wird die Spirale, von einem Zuflußrohr angezogen, wieder gefüllt, aber in der Weise, daß auch das Zuflußrohr über die Hälfte derselben Wasser enthalte und ebenso saugt man bei der betreffenden Hahnstellung auch in das andere Zuflußrohr Wasser. Somit ist die Spirale vollständig mit Wasser gefüllt und der noch mit Luft gefüllte Teil der Zuflußröhren kann schließlich von oben ergänzt werden. Die verbindenden Gummischläuche müssen dann natürlich unter vollständigem Ausschluß von Luft angebracht werden. Dies dürfte ganz leicht gelingen, wenn aber doch eine Luftblase in die Spirale gelangt, so kann diese durch einen raschen Abfluß von destilliertem Wasser (wenn nötig auch über 50 ccm) leicht weggebracht werden, besonders wenn man die Spirale leicht beklopft und dabei ihre Spitze etwas nach oben und stets derart hält, daß die Luftblase in die Spiralwindungen der Spitze zu aufsteige, um daselbst schließlich auszutreten.

Ich möchte indessen bemerken, daß dies gewöhnlich nicht nötig sein dürfte, da, wenn man die Füllung in der oben angegebenen Weise nur mit einiger Sorgfalt ausführt, Luftblasen in der Pipette nie vorhanden sein werden. Ist dann die Spiralphpipette einmal mit Flüssigkeit gefüllt, dann können bei einem richtigen Gebrauch des Apparates Luftblasen überhaupt nicht mehr in die Spirale gelangen: die Büretten dürften also nie unter dem Niveau des Nachfüllansatzes abgelassen werden.

Bei der Herstellung und Einstellung der Barytlauge empfiehlt es sich folgendermaßen vorzugehen: man nehme z. B. 400 g reinstes Baryumhydroxyd für 5000 ccm destilliertes Wasser; unter mehrmaligem Umschütteln läßt man die Lösung 3 Tage lang stehen und filtriert dann durch Faltenfilter. Die Barytlösung wird in der bereits beschriebenen Weise in die

Devillesche Flasche unter Kohlensäureabschluß abgefüllt<sup>1)</sup>. — Die Einstellung mit der Schwefelsäurebürette nehme man zuerst mit einer anderen Schwefelsäurebürette vor und stelle die Säure auf die Lauge ungefähr ein. Bei verschlossenem Nachfüllrohr der Säurepipette — welche übrigens mit der Devilleschen Säureflasche jetzt noch nicht verbunden ist — wird diese von oben mit der ungefähr einngestellten Säurelösung gefüllt. Die genaue Einstellung speziell auf die beiden verwendeten Spiralspipetten erfolgt nun in der Weise, daß man zuerst mit 15 ccm Barytlösung vorspült, dann diese bestimmte Menge von Lauge in der oben beschriebenen Weise mit 4 + 10 ccm destilliertem Wasser in ein Becherglas abspült und nun in dasselbe Gefäß in analoger Weise den Inhalt der mit der zu prüfenden Schwefelsäure entsprechend vorgespülten Spiralspipette, mit 4 + 10 ccm destilliertem Wasser des anderen Apparates abfüllt. Stimmen die Lösungen gut überein, so tritt nach Phenolphthaleinzusatz der Uebergangston auf, ist dies indessen nicht der Fall, so hat man der Schwefelsäurelösung so lange destilliertes Wasser bzw. stärkere Schwefelsäure zuzufügen, bis nach Zufügen der bestimmten Menge Säure in der mit Phenolphthalein versetzten Barytlösung die Uebergangsfarbe eintritt oder dieselbe durch Zusatz von ca. 2 ccm  $n_{100}$ NaOH zu erreichen ist. — Wenn man soweit ist, so kann schließlich der Nachfüllschlauch mit der Schwefelsäureflasche verbunden werden und es kann nun auch die Säurebürette von unten automatisch gefüllt werden. Zu beachten ist, daß bei längerem Stehen die Schwefelsäurelösung im unteren Teil der Flasche konzentrierter als im oberen Teil sein wird: deshalb soll die Schwefelsäureflasche jeden Tag vor Gebrauch umgeschüttelt werden. Ebenso empfiehlt es sich, die Säure- und Barytlösungen, welche über Nacht oder längere Zeit hindurch in den verbindenden Gummiröhren gestanden haben, vor dem Verbrauch abfließen zu lassen. — Es hat sich bewährt, beide Apparate neben einen Kasten zu montieren: auf den Kasten kommen 3 Devilleflaschen, eine für Baryt, eine für Schwefelsäure und eine für destilliertes Wasser. Das Ausflußrohr

1) Es empfiehlt sich, aus beiden Lösungen stets größere Mengen, ca. 5 Liter, zu bereiten, um sich ein häufiges Filtrieren zu ersparen.

dieser Flasche ist mit einer Y-artigen Teilung aus Glas versehen, so daß aus derselben das Wasser in zwei Büretten (Wasserbüretten des Säure- und Barytapparates) geleitet wird.

Bei der Beschreibung der Methodik trachtete ich alle Details zu berücksichtigen und wenn man diese Arbeiten mit dem Spiralapparat beachtet, da kommt man zu einer Methodik, welche aus den oben angeführten Gründen ein unvergleichlich einfacheres und rascheres Arbeiten gestattet, welche indessen die Genauigkeit betreffend der Ausführungsweise mit der Mikrapipette gegenüber nichts zu wünschen übrig läßt. Dies illustrieren die in Figg. 3 und 4 gezeichneten Diphtherie-

Fig. 3.

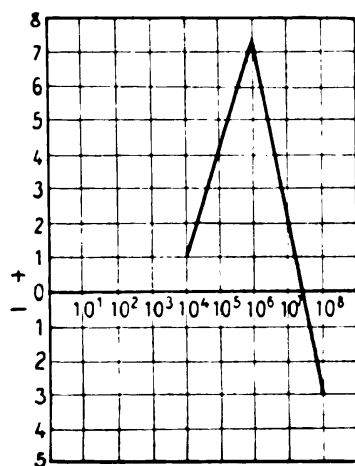


Fig. 4.

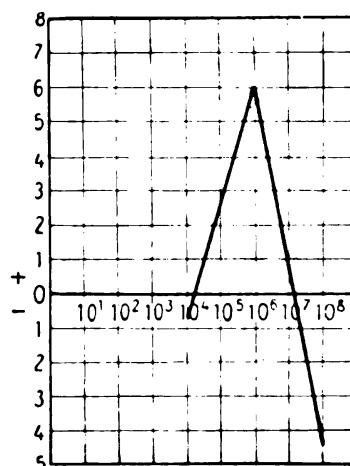


Fig. 3 und 4. Beide mit demselben Diphtherietoxin und Antiserum ausgeführt. Fig. 3 wurde mit der Spiralpipette, Fig. 4 mit der Mikrapipette ausgeführt.

kurven. Dieselben wurden mit einem Diphtherietoxin, welches ich dem Entgegenkommen des Herrn Prof. v. Fenyvessy verdanke, und mit einem ungarischen Diphtherieheilserum angestellt: die Unterschiede, welche beide Kurven aufweisen, sind nicht größer als die Fehlergrenze der Reaktion und sind ungefähr den Differenzen gleich, welche man bei Parallelbestimmungen mit der gleichen Methodik erhält.

Somit glaube ich alles, was zum Verständnis und zur Ausführung der Epiphaninreaktion nötig ist, kurz angeführt

zu haben, und in den nächsten Mitteilungen wollen wir auf die Resultate eingehen, welche wir mit ihr unter den verschiedenen Versuchsbedingungen erhalten haben.

### Zusammenfassung.

Im vorliegenden Aufsatz werden alle technischen Details besprochen, deren Einhaltung beim Arbeiten mit der Epiphaninreaktion nötig ist.

Durch die angegebene Spiralpipette ist es möglich, zahlreiche Fehlerquellen auszuschalten und dieselbe gestattet ein viel rascheres und bequemerer Arbeiten, insbesondere ist hierdurch das sonst mühsame und peinlich genaue Abmessen der Säure und der Barytlösung bedeutend erleichtert.

Da hierdurch die Methodik eine wesentliche Vereinfachung erfuhr, ist die Reaktion geeignet, in weitere Kreise einzudringen.

### Literatur.

- Weichardt, W., Berliner klin. Wochenschr., 1908, No. 20.  
— Chemiker-Zeitung, 1908, No. 20.  
— Vortr., 2. und 4. Tagung der Freien Vereinigung für Mikrobiologie, Berlin 1908 und 1910. Centralbl. f. Bakt., Abt. I, Ref., Bd. 42, Beiheft, p. 143, und Bd. 47, p. 36.  
— Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 6, Heft 4, p. 644.  
— Med. Klinik, 1909, No. 12. (Sitzung der phys. Ges. zu Berlin vom 19. Febr. 1909.)  
— Deutsche med. Wochenschr., 1911, No. 4.  
— und Kümmell, Münchn. med. Wochenschr., 1911, No. 32.  
Schrön, Münchn. med. Wochenschr., 1910, No. 38.  
— Deutsche med. Wochenschr., 1911, No. 6, p. 260, und No. 12, p. 559.  
Mosbacher, Deutsche med. Wochenschr., 1911, No. 22.  
Kammann, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 11, p. 178.  
Stötter, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 11, p. 749.  
Meyer, Fritz M., Berliner klin. Wochenschr., 1912, No. 6.  
Wohlens, H. E., Zeitschr. f. anorg. Chemie, Bd. 59, 1908, p. 203.  
Kraus, R., und Amiradzibi, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 6, H. 1, p. 16.



*Nachdruck verboten.*

[Aus der Prosektur des k. k. Wilhelminenspitales in Wien.]

## **Ueber die bindenden und immunisierenden Substanzen der Blutkörperchen.**

Von Dr. **Karl Landsteiner** und Dr. **Emil Prašek**.

(Eingegangen bei der Redaktion am 15. März 1912.)

Trotzdem eine Anzahl von Arbeiten über die fixierenden und immunisierenden Bestandteile der Blutkörperchen vorliegt, sind doch manche Fragen, die hier in Betracht kommen, nicht oder widersprechend beantwortet worden. So besteht noch keine volle Klarheit über die chemische Beschaffenheit der Antigene, die Bedeutung der Lipoiden für die Antigeneigenschaft, die Identität oder Verschiedenheit der fixierenden Stoffe für verschiedene Blutgifte, das Verhältnis der bindenden zu der immunisierenden Substanz, die Möglichkeit einer Modifikation der Antigeneigenschaften und die Bedingungen ihrer Zerstörung.

Demnach haben wir es für wünschenswert gehalten, den Gegenstand nochmals zu bearbeiten, um vielleicht einzelne dieser Punkte weiter aufzuklären, und wir teilen hier die ersten Resultate unserer Untersuchung mit.

Die Versuche wurden, soweit darüber nichts Besonderes erwähnt wird, mit Blutkörperchenstromata ausgeführt, die nach der Methode von Sachs<sup>1)</sup> hergestellt waren. Das gewaschene Kaninchenblut wurde bei 56°, gewaschenes Pferde- und Schweineblut bei 60° aufgelöst.

### **I. Erhitzte Stromata.**

Angaben über das Verhalten des Blutantigens bei Erhitzung machten Bang und Forssman<sup>2)</sup>. Sie fanden, daß in Kochsalzlösung aufgeschwemmte Blutkörperchen oder Stromata nach 2 Minuten langem Kochen ihr Bindungsvermögen verloren hatten, während die immunisierende Wirkung der Stromata oder aus ihnen durch fettlösende Flüssigkeiten ge-

1) Hofm. Beiträge, Bd. 2, 1902, p. 125.

2) Hofm. Beitr., Bd. 8, 1906, p. 238; Biochem. Zeitschr., Bd. 15, 1908, p. 19; vgl. Forssman, Biochem. Zeitschr., Bd. 9, 1908, p. 330, und die Einwände von Liebermann, Biochem. Zeitschr., Bd. 11, 1908, p. 405.

wonnener Extrakte bei der gleichen Behandlungsweise mindestens zum größten Teile erhalten blieb.

Bang und Forssman ziehen aus diesem Verhalten den Schluß einer Verschiedenheit der immunisierenden und fixierenden Substanzen [vgl. die von Sachs<sup>1)</sup> gegen diese Deduktion gemachten Einwände].

Im Gegensatz zu Bang und Forssman finden hingegen Muir und Ferguson<sup>2)</sup>, daß ein kleiner Teil des Bindungsvermögens schon bei mäßiger Erhitzung zerstört wird, ein beträchtlicher Teil aber selbst bei 1-stündigem Erhitzen noch erhalten bleibt. Allerdings sind diese Resultate mit einer anderen Methode erhalten als in der früher zitierten Arbeit. Während nämlich Bang und Forssman die Bindungsfähigkeit der hämolytischen Immunstoffe direkt untersuchten, machten Muir und Ferguson die Bestimmung durch Auswertung des Komplementverlustes, der nach der Mischung von Stromata, hämolytischem Immunkörper und Komplement eintritt. Die Resultate der beiden Arbeiten sind daher nicht unmittelbar vergleichbar, auch wenn der von Sachs berührte Einwand, daß erhitzte Stromata ohne Mitwirkung von hämolytischem Immunkörper Komplement fixieren könnten, für die referierten Versuche nicht sehr in Betracht kommen sollte [vgl. Forssman<sup>3)</sup>]. So wäre es möglich, daß die beobachtete Komplementbindung durch andersartige als hämolytische Immunkörper, etwa durch Präzipitine oder verwandte Stoffe bzw. Bordet-Gengousche Antikörper, zustande käme. In einer neuen Arbeit findet aber Muir<sup>4)</sup> auch bei direkter Bestimmung, daß gekochte Blutkörperchen hämolytische Immunkörper noch spezifisch absorbieren können.

Wir selbst haben in früheren Versuchen eine beträchtliche Hitzebeständigkeit der agglutininbindenden Substanzen des Blutes bei selbst mehrstündigem Kochen festgestellt<sup>5)</sup>, als wir die Absorption von Agglutininen des normalen Hühnerserums durch Schweinestromata untersuchten.

1) Lubarsch-Ostertag, Ergebnisse, Bd. 11, 1907, p. 550.

2) Journ. Bact. and Path., Vol. 11, 1906, p. 84.

3) Biochem. Zeitschr., Bd. 15, 1908, p. 19; Bd. 23, 1909, p. 146.

4) Biochem. Zeitschr., Bd. 21, 1909, p. 510.

5) Oppenheimers Handb. d. Biochem., Bd. 2, 1909, p. 427.

Der Widerspruch zwischen den angeführten Resultaten erklärt sich, wie die folgenden Versuche erkennen lassen, teils daraus, daß die fixierenden Substanzen sich verschiedenen, darauf einwirkenden Stoffen gegenüber ungleich verhalten, teils aus Verhältnissen quantitativer Natur.

Unsere Untersuchung erstreckte sich auf die Absorption von Pflanzenagglutininen, normalen und spezifischen Serumagglutininen und Lysinen, sowie des Arachnolysins.

Bei den Absorptionsversuchen wurden native Stromata, und durch 1 Stunde im Dampftopf auf 100° erhitzte, mit den zu untersuchenden Lösungen zusammengebracht, unter mehrmaligem Umschütteln 1 Stunde bei Zimmertemperatur (bei Arachnolysin 2 Stunden bei 37°) und nachher etwa 20 Stunden im Eiskasten stehen gelassen. Hierauf wurde scharf zentrifugiert, und der in den Tabellen angegebene Agglutininwert oder Lysinwert der Lösung durch Feststellung des Grenztiters mit gewaschenem Blut ermittelt. (Reihen mit um die Hälfte fallender Konzentration der aufeinanderfolgenden Proben; Volumen der einzelnen Probe 0,5 ccm.) Zum Vergleich diente eine mit entsprechendem Volumen Kochsalzlösung versetzte Kontrollprobe.

#### Pflanzenagglutinine.

Als agglutinierende Lösungen wurden stark wirkende 10–20-proz. (zum Teil gereinigte) Extrakte von Jequritysamen, Bohnen, Linsen und Crotonsamen in folgenden Verdünnungen verwendet:  $\frac{1}{1000}$  Abrin,  $\frac{1}{4000}$  Bohnen,  $\frac{1}{300}$  Linsen,  $\frac{1}{50}$  Crotin.

Zur Absorption von Abrin, Bohnen- und Linsenextrakt wurden Pferdstromata verwendet, bei Crotin a Schweinestromata, bei Crotin b Kaninchenstromata, und zwar 0,4 ccm Stromata + 2 ccm der Agglutininlösungen. Titrierung mit 2 Tropfen 5-proz. Pferdeblut bzw. Schweineblut.

	Abrin	Bohnen	Linsen	Crocin a	Crocin b
Kontrolle	64	128	16	16	16
Stromata	2	8	2	4	3
gekochte Stromata	3	8	2	4	3
	Pferdeblut			Schweineblut	

#### Serumagglutinine.

0,4 ccm Stromata + 4 ccm 10-fach verdünntes inaktives ( $\frac{1}{10}$  Stunde bei 56°) normales Hühnerserum. Titriert mit 2 Tropfen 2-proz. Blut.

Aus Kaninchenblut	Kontrolle	64
	Stromata I	8
	gekochte Stromata I	8
	Stromata II	8
	gekochte Stromata II	16
	Kaninchenblut	

Aus Pferdeblut	Kontrolle	32	64
	Stromata	2	64
	gekochte Stromata	2	64
Aus Ka- ninchenblut	Stromata	16	2
	gekochte Stromata	16	4
		Pferdeblut	Kaninchenblut

0,3 ccm Taubenstromata + 1,5 ccm der Serumverdünnungen.

KNS = inaktivierte normale Kaninchensera (No. 235, 295) 5-fach verdünnt.

IS = Immunsera No. 212 100-fach verdünnt.

No. 254 1000-fach verdünnt.

Titriert mit 2 Tropfen 2-proz. Taubenblut.

KNS No. 235	Kontrolle	16	IS No. 212	Kontrolle	16
	Stromata	1		Stromata	0
	gekochte Stromata	2		gekochte Stromata	16
KNS No. 195	Kontrolle	16	IS No. 254	Kontrolle	4
	Stromata	2		Stromata	0
	gekochte Stromata	4		gekochte Stromata	2

0,4 ccm Stromata aus Meerschweinchenblut + 1,5 der Serumverdünnungen. KNS No. 295 5-fach verdünnt; IS No. 209 50-fach verdünnt durch Zusatz von nicht agglutinierendem 5-fach verdünntem normalem Kaninchenserum, um die Differenz in der Eiweißkonzentration bei normalem und Immuns serum auszuschalten.

Titriert mit 2 Tropfen 2-proz. Meerschweinchenblut

KNS No. 295	Kontrolle	4
	Stromata	0
	gekochte Stromata	0
IS No. 209	Kontrolle	16
	Stromata	1
	gekochte Stromata	8

0,4 ccm Stromata aus Pferdeblut + 1,5 ccm der Serumverdünnungen. KNS No. 237 5-fach verdünnt, IS No. 268 500-fach verdünnt mit nicht agglutinierendem normalen Kaninchenserum (wie oben).

Titriert mit 2 Tropfen 2-proz. Pferdeblut.

KNS No. 295	Kontrolle	8
	Stromata	1
	gekochte Stromata	0
IS No. 268	Kontrolle	12
	Stromata	2
	gekochte Stromata	8

# Bindende und immunisierende Substanzen der Blutkörperchen. 407

0,5 ccm Stromata aus Pferdeblut + 1,5 ccm der 5-fach verdünnten normalen Kaninchensera.

Titriert mit 2 Tropfen 2-proz. Pferdeblut.

NKS	No. 159	No. 215	No. 265	No. 155	No. 205
Kontrolle	8	4	16	8	4
Stromata	1	0	2	0	1
1 <sup>b</sup> gekochte Stromata	2	1	4	0	0
5 <sup>b</sup> „ „	—	1	—	—	—

0,5 ccm Stromata aus Pferdeblut + 1,5 ccm der verdünnten Immunsera. IS No. 243 1000-fach, No. 268 und 260 400-fach, No. 203 100fach, No. 261 und 244 50-fach verdünnt.

Titriert mit 2 Tropfen 5-proz. Pferdeblut.

IS	No. 243	No. 268	No. 260	No. 203	No. 261	No. 244
Kontrolle	16	16	32	32	64	8
Stromata	2	1	8	8	2	1
1 <sup>b</sup> gekochte Stromata	8	8	32	32	32	4
5 <sup>b</sup> „ „	—	8	—	—	32	—

## Serumlysine.

0,5 ccm Stromata aus Pferdeblut + 1,5 ccm der verdünnten Immunsera. IS No. 261 100-fach, No. 260 und No. 243 200-fach verdünnt.

Titriert mit 2 Tropfen 5-proz. Pferdeblut, vorheriger Zusatz von 1 Tropfen Meerschweinchenserum.

Ablesung nach 20 Minuten bei 37°.

IS	No. 261	No. 260	No. 243
Kontrolle	4	8	16
Stromata	0	0	2
1 <sup>b</sup> gekochte Stromata	2	4	16

## Arachnolysin und Lysin der Crotonsamen.

2 ccm Arachnolysin 400-fach verdünnt + 0,2 resp. 0,05 ccm Stromata aus Kaninchenblut.

Titriert mit 4 Tropfen 5-proz. Kaninchenblut.

Ablesung nach 2 Stunden Thermostat 37°, Nacht Eiskasten.

	I	II	III	IV	V
Kontrolle	16	16	16	8	16
Stromata 0,2 ccm	2	2	1	1	1
Stromata 0,05 ccm	8	.	.	.	.
1 <sup>b</sup> gekochte Stromata 0,2 ccm	.	16	16	.	.
1 <sup>b</sup> „ „ 0,2 „	16	.	.	8	.
2 <sup>b</sup> „ „ 0,2 „	.	.	.	.	16

27\*

2 ccm Crotin 50-fach verdünnt + 0,5 ccm Stromata.

Titriert mit 2 Tropfen 5-proz. Kaninchenblut.

Ablesung nach 1 Stunde Thermostat 37°.

Aus Schweineblut	Kontrolle	8
	Stromata	2
	1 <sup>b</sup> gekochte Stromata	2
Aus Ka- ninchenblut	Stromata	1
	1 <sup>b</sup> gekochte Stromata	1

#### Staphylolysin.

2 ccm Staphylolysin 100-fach verdünnt + 0,4 ccm Kaninchenstromata.

Titriert mit 4 Tropfen 5-proz. Kaninchenblut.

Ablesung nach 2 Stunden Brutofen.

Kontrolle	16
Stromata	16

Die Versuche zeigen als bemerkenswertestes Resultat, daß das Bindungsvermögen der Stromata sich bei gleichen Eingriffen ganz verschieden verhält, je nachdem man die Bindung einer oder der anderen auf Blut wirkenden Substanz prüft. Sehr auffallend ist dieses Verhältnis bei der Betrachtung der Absorption von Arachnolysin einerseits und Pflanzenagglutininen andererseits. Während die Bindung dieser Stoffe, wie auch des Lysins der Crotonsamen durch einstündiges Erhitzen der Stromata auf 100° nicht geändert wird, ist das Bindungsvermögen für Arachnolysin vollständig verloren gegangen. (Bei Staphylolysin haben wir in zwei Versuchen mit den von uns hergestellten Stromata eine Bindung überhaupt nicht nachweisen können.) Man muß also wohl den Schluß ziehen, daß die einzelnen Gruppen von Blutgiften durch verschiedenartige chemische Angriffspunkte charakterisiert sind, eine Folgerung, die auch durch die in den folgenden Abschnitten wiedergegebenen Beobachtungen bestätigt wird.

Auch bei den Serumagglutininen sind die Verhältnisse etwas komplizierter, als man zunächst denken könnte. Wir fanden, daß das Bindungsvermögen der Stromata für Agglutinine und Lysine von Immunseren durch Erhitzen wesentlich beeinträchtigt wird. Die Größe des Verlustes war in den einzelnen Versuchen nicht gleich. Einige Male war unter den gewählten Bedingungen keine Absorption zu bemerken, so wie es den Angaben von Bang und Forssman entspricht, in anderen Versuchen blieb ein Teil des Bindungsvermögens erhalten, wie bei Muir und Fergusson, der Verlust war

aber immer ein beträchtlicher. Die Absorption von Immunsynen verhielt sich ganz ähnlich wie die der Agglutinine. Die normalen Sera verhalten sich etwas anders. Das Bindungsvermögen der Stromata für normale Agglutinine wurde in unseren Versuchen durch Erhitzen der Stromata immer verhältnismäßig weniger herabgesetzt als bei Immunseren, ja manchmal war eine Verminderung überhaupt nicht zu bemerken. Dieses Verhalten läßt in Uebereinstimmung mit den früher von uns geäußerten Ansichten über Verschiedenheiten der normalen und Immunantikörper in bezug auf die Spezifität auch eine gewisse Verschiedenheit des Bindungsvorganges im allgemeinen annehmen.

Der Umstand, daß erhitze Stromata immerhin noch Immunagglutinine binden, muß davon abhalten, der Folgerung von Bang und Forssman zuzustimmen, daß hier ein Fall vorliegt, in dem die fixierenden und immunisierenden Substanzen verschieden sind. Bei der Beurteilung dieser Ansicht kommt aber noch in Betracht, daß es doch nötig ist, das Fixierungsvermögen veränderter Stromata mit einem solchen Immunserum zu prüfen, das durch Injektion eben der veränderten Stromata hergestellt wurde, da man nicht ausschließen kann, daß ein solches Serum sich anders verhielte als ein gewöhnliches Blut-Immunserum. Um diesen Punkt zu untersuchen, haben wir Kaninchen mit nach Sachs hergestellten Pferdestromata und parallel dazu andere Tiere mit denselben, aber vorher erhitzten Stromata behandelt (s. unten). Mit den zwei Arten von Immunsera, die, abgesehen von der Verschiedenheit des Antigens, ganz gleich hergestellt und gleich alt waren, wurden Absorptionsversuche ausgeführt.

0,5 ccm Stromata aus Pferdeblut + 1,5 ccm der Serumverdünnungen. IS No. 299, 276, 283 und 148 100-fach verdünnt; IS No. 228, 164 und 300 25-fach verdünnt. Titriert mit 2 Tropfen 5-proz. Pferdeblut.

IS:	Immunsera, hergestellt durch Injektionen von unveränderten Pferdeblutstromata				Immunsera, hergestellt durch Injektionen von 1 <sup>h</sup> gekochten Pferdeblutstromata			
	No. 299	No. 276	No. 276	No. 283	No. 228	No. 164	No. 148	No. 300
Kontrolle	10	32	8	32	32	32	32	32
Stromata	0	2	0	0	1	1	1	1
1 <sup>h</sup> gekochte Stromata	8	32	3	8	2	1	1	4

## Lysis.

0,5 ccm Stromata aus Pferdeblut + 1,5 ccm der Serumverdünnungen. IS No. 276, 283, 148 100-fach, No. 164 50-fach verdünnt. Titriert mit 2 Tropfen 5-proz. Pferdeblut nach Zusatz von 1 Tropfen Meerschweinchen-serum. Ablesung nach 1 Stunde Brutofen.

IS:	Immunsera, hergestellt durch Injektion von unveränderten Pferdeblutstromata		Immunsera, hergestellt durch Injektionen von 1 <sup>b</sup> gekochten Pferdeblutstromata	
	No. 276	No. 283	No. 148	No. 164
Kontrolle	16	16	8	16
Stromata	0	0	0	1
1 <sup>b</sup> gekochte Stromata	16	4	0	1

Die Immunsera, die nach Injektion von Stromata entstehen, verhalten sich, wie aus den Versuchen zu entnehmen ist, in bezug auf die Absorption ebenso, wie die vorher untersuchten Sera mit intakten Blutkörperchen injizierter Kaninchen. Auch hier haben gekochte Stromata ein geringeres Bindungsvermögen als native. Die Differenzen sind in den einzelnen Versuchen nicht immer gleich, und selbst bei einem und demselben Serum hatten wir einige Male wechselnde Resultate<sup>1)</sup>, wovon auch die Tabelle ein Beispiel gibt; immer aber ist, wie gesagt, die Herabminderung des Bindungsvermögens sehr beträchtlich. Merklich verschieden sind unsere Resultate bei der Immunisierung mit erhitzten Stromata. Die Immunstoffe, die bei dieser Art der Vorbehandlung entstanden, wurden von erhitzten Stromata ebenso oder nicht viel schlechter als von nativen Stromata gebunden. Demnach liegt hier vielleicht eine verwandte Erscheinung vor, wie bei den von Obermayer und Pick hergestellten Präzipitinen gegen erhitztes Eiweiß, wenn auch in unserem Falle die spezifische Einstellung nicht so weit geht, daß die Reaktion der „Coctosera“ mit dem erhitzten Antigen ausgeprägter wäre als mit dem unveränderten. Ähnliche Beobachtungen machten übrigens auch Obermayer und Pick. Sollten weitere Untersuchungen ergeben, daß die Erscheinung auch hier, wie es Obermayer und Pick annehmen, auf einer physikalischen Zustandsänderung des Antigens, die als Koagulation von

1) Die Ursache dieses Verhaltens können wir nicht angeben (Verschiedenheit der Stromata? Alter des Serums?).



Eiweißkörpern anzusehen wäre, beruht, so wäre das beschriebene Verhalten für die Aufklärung der chemischen Natur des Lysinogens und Agglutinogens von Wert.

Was die von Bang und Forssman aufgeworfene Frage betrifft, so zeigt sich, wenn man zu dem Antigen homologe Immunstoffe benützt, in sehr klarer Weise, daß erhitzte Blutstromata nicht nur immunisieren, sondern auch Lysin und Agglutinin fixieren.

Nebenbei ist zu bemerken, daß in bezug auf die Absorbierbarkeit geänderte Immunsera auch dann entstehen können, wenn man die zur Immunisierung verwendeten Stromata nicht erhitzt, sondern in anderer Weise verändert. Wir haben bisher solche Immunsera hergestellt, indem wir Stromata injizierten, die mit Formaldehyd<sup>1)</sup> behandelt waren. Auch diese Sera werden von Formaldehydstromata und ebenso von erhitzten Stromata besser gebunden als gewöhnliche Immunsera. Eine Spezifität in bezug auf die einzelnen Substanzen haben wir in unseren, bisher nicht zahlreichen Versuchen nicht sicher nachweisen können.

0,5 ccm Stromata + 1,5 ccm der Serumverdünnungen. Titriert mit 2 Tropfen 5-proz. Pferdeblut.

	Immunsera, hergestellt durch Injektionen von 1 <sup>a</sup> gekochten Pferdeblutstromata			Immunsera, hergestellt durch Injektionen von Pferdeblutstromata, die mit Formaldehyd behandelt waren		
	No. 164 ( $\frac{1}{50}$ )	No. 164 ( $\frac{1}{25}$ )	No. 148 ( $\frac{1}{25}$ )	No. 202 ( $\frac{1}{50}$ )	No. 202 ( $\frac{1}{25}$ )	No. 241 ( $\frac{1}{25}$ )
Kontrolle	4	32	32	3	16	8
Stromata	0	1	1	0	1	2
1 <sup>a</sup> gekochte Stromata	0	1	1	0	1	4
Formaldehydstromata	0	6	2	0	4	4

## II. Mit Alkohol behandelte Stromata.

Im Anschluß an die Veränderungen, die die Stromata beim Erhitzen erleiden, prüften wir den Einfluß eines Eiweißfällungsmittels, nämlich des Alkohols.

1) Die Stromata wurden mit dem gleichen Volum 40-proz. Formaldehyd versetzt, 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen, dann mehrmals mit Kochsalzlösung gewaschen.

Die dem Blutvolumen entsprechende Emulsion der Stromata wurde bei Zimmertemperatur mit dem 5-fachen Volumen 95-proz. Alkohol zusammengebracht, nach 24 Stunden abzentrifugiert und nochmals mit derselben Alkoholmenge versetzt; nach 24 Stunden wieder abzentrifugiert, einmal mit Kochsalzlösung ausgewaschen und auf das ursprüngliche Volumen gebracht.

Anordnung und quantitative Verhältnisse der Versuche — wo nichts anderes erwähnt ist — entsprechend den analogen im I. Abschnitte.

## Abrin.

Aus Pferde- blut	Kontrolle	32	aus Kan- Blut	Kontrolle	64
	Stromata	2		0,05 ccm Stromata	0
	Alkohol-			0,05 ccm Alkoholstromata	0
	stromata	12		0,01 ccm Stromata	6
		Pferde- blut		0,01 ccm Alkoholstromata	32
					Pferdeblut

## Crotin.

Aus Schweineblut	Kontrolle	64
	Stromata	6
	Alkoholstromata	20
		Schweineblut

## Hühnerserum (normal, inaktiviert).

Aus Pferdeblut	Kontrolle	32	64
	Stromata	4	64
	Alkoholstromata	12	64
Aus Kaninchenblut	Stromata	12	4
	Alkoholstromata	24	16
		Pferdeblut	Kaninchenblut

Kaninchennormalserum No. 155, inaktiviert. Pferdeblutstromata.

## Agglutination.

Kontrolle	16
Stromata	2
Alkoholstromata	6
	Pferdeblut

Pferdeimmunserum Kan. No. 299. Pferdeblutstromata.

	Agglutination	Lyse
Kontrolle	16	16
Stromata	0	0
Alkoholstromata	8	8
	Pferdeblut	

## Arachnolysin. Kaninchenblutstromata.

Kontrolle	16
Stromata	2
Alkoholstromata	16
	<hr/>
	Kaninchenblut

Nach diesen Resultaten findet durch Alkohol eine Veränderung der Stromata statt, derart, daß ihre Aufnahmefähigkeit für die verschiedenen Stoffe, die wir geprüft haben, sich verringert. Am ausgesprochensten war die Beeinflussung wieder in bezug auf das Arachnolysin, da hier eine vollständige Aufhebung des Bindungsvermögens eintrat. Bei den verschiedenen Arten von Agglutininen haben wir bei den bisher angestellten Versuchen keine genügend großen Differenzen erhalten, um eine allgemeine Regel aufstellen zu können, wenn es auch nicht ausgeschlossen ist, daß eine genauere quantitative Untersuchung solche Differenzen aufdecken würde. Es muß auch noch offen bleiben, inwieweit die Verminderung der Bindungskraft auf der gröberen Verteilung der Stromata beruht, die sich nach der Alkoholbehandlung immer rascher absetzen als in ihrem ursprünglichen Zustand. Andererseits besteht aber auch die Möglichkeit, daß sowohl diese physikalische Veränderung als auch die Verminderung des Bindungsvermögens Folgen einer durch den Alkohol bedingten chemischen Aenderung des Eiweißes sind. Jedenfalls bleibt auch nach Behandlung mit 95-proz. Alkohol bei Zimmertemperatur noch ein beträchtlicher Teil des Bindungsvermögens erhalten, und zwar, wie der Versuch mit Hühnerserum zeigt, eines spezifischen Bindungsvermögens. (Bei der Absorption von Immunserum wurde, ebenso wie in den Versuchen der Abschnitte I und III, eine Prüfung auf Spezifität nicht gemacht.) Dies bestätigen auch die im letzten Abschnitt zu erwähnenden Immunisierungsversuche.

Bei der Absorption des Arachnolysins haben wir uns in besonderen Versuchen über die Bedeutung der Lipide für diesen Vorgang zu orientieren getrachtet. Es zeigte sich allerdings, daß durch Behandlung mit Fettlösungsmitteln das Bindungsvermögen der Stromata herabgesetzt wird, doch war auch nach der Extraktion mit Aether die spezifische Absorptionsfähigkeit noch zum Teil erhalten. Aus Blut extrahierte

Lipoide neutralisieren allerdings in nicht unbeträchtlichem Grade das Arachnolysin; man erhält aber derartig wirkende Lipoide nicht nur aus Kaninchenblut, sondern auch aus solchen Blutarten, die für Arachnolysin unempfindlich sind und es nicht merklich absorbieren. Eine spezifische Wirkung der lipoiden Extrakte war demnach nicht nachweisbar.

### III. Einwirkung von Formaldehyd.

Als weiteres Beispiel einer Eiweißveränderung untersuchten wir die Einwirkung von Formaldehyd auf Stromata.

Die dem Blutvolumen entsprechende Emulsion der Stromata wurde mit dem gleichen Volumen 40-proz. Formaldehyd versetzt, nach 24 Stunden (bei Zimmertemperatur) einige Male in Kochsalzlösung gewaschen und auf das ursprüngliche Volumen gebracht.

Abrin.					
Aus Pferde- blut	Kontrolle	32	Aus Kan.- Blut	Kontrolle	64
		4			0
	Formaldehyd- stromata	16		0,05 „ Formaldehydstromata	0
		Pferde- blut			6
				0,01 „ Stromata	6
				0,01 „ Formaldehydstromata	16
					Pferdeblut

Crotin.			
Aus Schweineblut	Kontrolle	64	Schweineblut
		6	
	Formaldehydstromata	6	

Hühnerserum (normal, inaktiviert).					
Aus Pferdeblut	Kontrolle	32	Pferdeblut	Kontrolle	64
		4			64
	Formaldehydstromata	4		Formaldehydstromata	64
Aus Ka- ninchenblut	Kontrolle	12	Pferdeblut	Kontrolle	4
		16			12
	Formaldehydstromata			Formaldehydstromata	

Kaninchen-Normalserum No. 155, inaktiviert. Pferdeblutstromata.

#### Agglutination.

Kontrolle Stromata Formaldehydstromata	16
	2
	6
	Pferdeblut

## Pferdeimmunserum Kan. No. 299, 260. Pferdeblutstromata.

## Agglutination.

	No. 299	No. 260
Kontrolle	16	64
Stromata	0	4
Formaldehydstromata	8	24
	Pferdeblut	

## Lyse.

	No. 299
Kontrolle	16
Stromata	0
Formaldehydstromata	4

## Arachnolysin. Kaninchenstromata.

Kontrolle	16
Stromata	2
Formaldehydstromata	4

Auch die durch Formaldehyd veränderten Stromata zeigen wie Alkoholstromata ein vermindertes Bindungsvermögen; doch bleibt auch hier ein beträchtlicher Teil derselben und die Spezifität erhalten (siehe den Versuch mit Hühner Serum). Unterschiede im Verhalten der einzelnen Immunstoffe gegenüber Formaldehydstromata, so wie wir sie im Falle der erhitzten Stromata feststellen konnten, mögen vielleicht auch hier bestehen, doch reicht unser Versuchsmaterial nicht aus, um über diesen Punkt zu entscheiden.

Die Formaldehydeinwirkung ist deshalb von Interesse, weil nach der gewöhnlichen Annahme durch Formaldehyd Amidogruppen des Eiweißes infolge des Eintrittes von Methylengruppen ihrer Reaktionsfähigkeit beraubt werden<sup>1)</sup> und die Proteine infolgedessen einen mehr sauren Charakter annehmen. Erst vor kurzem haben, ähnlich wie vorher Schiff, Obermayer und Wilhelm<sup>2)</sup>, dieses Verhalten durch Formoltitration nach der Methode von Sørensen nachweisen können.

Man könnte aus dem Umstande, daß nach der Formalineinwirkung die spezifische Bindungsfähigkeit nicht verloren geht, trotzdem man eine Inaktivierung von Amidogruppen der

1) Vgl. Cohnheim, Chemie der Eiweißkörper, 2. Aufl., p. 126.

2) Biochem. Zeitschr., Bd. 38, 1912, p. 331.

eiweißartigen Bestandteile der Stromata anzunehmen hat, einen Gegensatz zu unserer öfters ausgesprochenen Annahme finden, daß die Immunverbindungen, ähnlich wie Farbstoffverbindungen, durch elektrochemische Neutralisation nach Art einer Salzbildung entstehen. Um hierüber Aufklärung zu erhalten, haben wir die Einwirkung von Farbstoffen (Safranin, Toluidinblau, Diaminreinblau, Methylorange, Eosin) auf Formaldehydstromata geprüft<sup>3)</sup>. Hierbei zeigte sich tatsächlich eine stärkere Färbbarkeit der Formaldehydstromata durch die basischen und eine geringere durch die sauren Farbstoffe im Vergleich zu unveränderten Stromata. Am deutlichsten war der Unterschied bei Safranin, Toluidinblau und Diaminreinblau. Immerhin war aber die Differenz nicht groß und die Färbbarkeit durch saure Farbstoffe nicht aufgehoben; beim Eosin war die beobachtete Differenz recht gering. Demnach findet sowohl bei Farbstoffen als auch bei Agglutininen nach der Behandlung mit Formaldehyd nur eine unvollständige Aenderung des Bindungsvermögens der Stromata statt, so daß die Ergebnisse mit unserer Annahme nicht im Widerspruch stehen, ganz abgesehen davon, daß es schwierig ist, über die Art des Einflusses bei der Bindung der amphoteren Immunstoffe eine Voraussage zu machen.

#### IV. Immunisierungsversuche.

Die folgenden Zahlen stellen die Ergebnisse von Immunisierungsversuchen dar, bei denen erwärmte, durch Formaldehyd, Alkohol und Aether veränderte Stromata, sowie Aetherextrakt aus Blutkörperchen verwendet wurde.

Den ca. 2000 g schweren Kaninchen wurde eine Aufschwemmung der Antigene in 8-tägigen Intervallen intraperitoneal injiziert, und zwar Mengen, die jedesmal 10 ccm des ursprünglichen Pferdeblutes entsprachen. Vor der ersten Injektion wurden den Tieren einige ccm Serum entnommen und eingefroren aufbewahrt. Die Prüfung der Sera nahmen wir 10 Tage nach der dritten Injektion vor.

Gekochte Stromata: Die Herstellung ist im I. Abschnitt beschrieben.

---

3) Wir verwendeten hierzu wegen ihrer helleren Farbe nach der Methode von Dautwitz und Landsteiner (Hofm. Beitr., Bd. 9, 1907, p. 431) mit Hilfe von Toluol hergestellte Stromata.

**Formaldehydstromata:** Die Herstellung ist im III. Abschnitt beschrieben.

Erhitzung im Autoklaven auf 115° durch  $\frac{1}{2}$  Stunde in einer dem Blutvolumen entsprechenden Menge 1-proz. NaCl-Lösung.

**Aether-Alkoholstromata:** Die dem Blutvolumen entsprechende Stromaemulsion wurde 5mal mit dem 5-fachen Volumen Aether durch je 15 Minuten im Schüttelapparat geschüttelt; dann mit dem 5-fachen Volumen 95-proz. Alkohol 2mal durch je 1 Stunde am Rückflußkühler extrahiert, abzentrifugiert, mit Kochsalzlösung gewaschen.

**Aetherextrakt:** 10 ccm 3mal gewaschenes Pferdeblut 3mal mit je 50 ccm Aether im Schüttelapparat geschüttelt, Aether durch Filtrierpapier No. 602 (Schleicher und Schüll) filtriert, bis auf einen kleinen Rest eingedampft, in steriler Kochsalzlösung aufgenommen.

Titration wie oben. Für Hämolyse Zusatz von  $\frac{1}{4}$ —1 Tropfen Meer-schweinchenserum und 2 Tropfen 5-proz. Pferdeblut. Ablesung nach  $1\frac{1}{2}$  Stunde bei 37°. Bei den Agglutininproben Zusatz von 2 Tropfen 2-proz. Pferdeblut. Ablesung am nächsten Tag. (1 Stunde Zimmertemperatur, dann Eiskasten.)

No.	Immunisierung	Vor der Immunisierung		Nach der Immunisierung	
		Agglutination	Lysis	Agglutination	Lysis
283	Pferdestromata	5	40	3200	3200
299		—	—	1600	1600
113	1 <sup>h</sup> gekochte Pferde-stromata	10	80	400	400
148		5	160	800	3200
164		10	80	1200	1600
72	Formaldehyd-Pferdestromata	10	40	800	800
202		20	40	1000	800
241		20	40	800	1600
331	auf 115° erhitzte Pferdestromata	80	80	400	640
334		40	80	400	320
336		—	—	200	640
242	durch Aether und	< 5	40	300	100
145	Alkohol extrahierte	5	40	600	80
298	Pferdestromata	5	80	300	300
181	Aetherextrakt aus Pferdeblut	15	128	100	200
173		5	64	40	200
271		5	16	40	200

Die Stromata behalten also nach dem Kochen und nach der Behandlung mit Formaldehyd in beträchtlichem Maße die Fähigkeit der Antikörperproduktion bei. Daß die immunisierende Wirksamkeit durch diese Eingriffe etwas abgeschwächt wurde, ist nach den von uns beobachteten Immunisierungswerten wohl möglich, doch sind die Versuche zu wenig zahlreich, um ein bestimmtes Urteil abgeben zu können. Ein

Unterschied im Verhalten der Immunagglutinine und Immunslysine ließ sich nicht feststellen, ebensowenig wie bei den im Vorhergehenden angeführten Absorptionsversuchen.

Dieses Resultat schien uns mit den Angaben von Dubois<sup>1)</sup> in Widerspruch zu stehen, denen zufolge nach Injektionen von auf 115° im feuchten Zustande erhitzten Hühnerblut nur Agglutinine, nicht wie nach Injektion unveränderten Blutes Agglutinine und Lysine entstehen. Wir haben diese Versuche wiederholt und wie es scheint, trat bei den genau nach dem Verfahren von Dubois behandelten Tieren nicht nur Agglutinin-, sondern auch Lysinbildung ein. Die Versuche waren aber nicht vollständig zufriedenstellend, da die Sera schon vor der Immunisierung, wenn auch schwächer als nachher, lösten und da wir bei der Titration unter Zuhilfenahme von Meerschweinchenkomplement unregelmäßige Reihen erhielten. Wir haben deshalb, und um einen Vergleich mit unseren übrigen Versuchen möglich zu machen, auch Pferdestromata nach dem Verfahren von Dubois behandelt und nur die Einwirkung durch längere Dauer der Erhitzung intensiver gestaltet. Wie die Tabelle zeigt, gab dieses Verfahren keinen Anhaltspunkt für ein verschiedenes Verhalten der agglutinogenen und lysinogenen Substanz.

Etwas anders verhielten sich die mit Aether und Alkohol behandelten Stromata sowie der Aetherextrakt. Bei den mit Aether und Alkohol extrahierten Stromata ist die Agglutininbildung ziemlich kräftig, nicht viel schwächer als z. B. bei mit Formaldehyd behandelten, hingegen ist die Steigerung der lytischen Wirkung eine recht geringe. Die mit Aetherextrakt immunisierten Tiere haben ziemlich kleine Serumwerte. Im Verhältnis zu den mit Aether-Alkoholstromata injizierten Tieren ist der Agglutinititer im Vergleich zu dem des Lysins ein niedriger. Dieses Ergebnis ist das einzige in unseren Versuchsreihen, das einigermaßen für ein differentes Verhalten der agglutinogenen und lysinogenen Substanz spricht, wenn auch der beobachtete Unterschied nur ein quantitativer und nicht wie in den von Frouin<sup>2)</sup> mitgeteilten Versuchen ein absoluter

1) Ann. Pasteur, Bd. 16, 1902, p. 690; siehe Sachs, Lubarsch-Ostertag, Ergebnisse, Bd. 11, p. 539.

2) Soc. Biol., Bd. 62, 1907, p. 153.



ist. Allerdings enthält die Arbeit von Frouin keine Angaben über die Werte der Sera vor und nach der Immunisierung. Wir haben die Versuche von Frouin nachgemacht, aber kein vollständiges Resultat erhalten, da die mit Aceton injizierten Tiere vorzeitig zugrunde gingen. Die andere Hälfte des Versuches, nämlich die Immunisierung mit den durch Aceton extrahierten Stromata, stimmte mit den Resultaten von Frouin nicht überein, obwohl wir uns genau an seine Angaben hielten. Die Sera von zwei derart behandelten Tieren zeigten nur eine recht mäßige Erhöhung der Agglutininwerte (um das 8-fache) und die Zunahme der Lysinwerte durch die Immunisierung war nicht wesentlich geringer.

Unsere Resultate über Immunisierung durch Aetherextrakte entsprechen den früheren Angaben von Bang und Forssman<sup>1)</sup> und Dautwitz und Landsteiner<sup>2) 3)</sup>.

Wir halten aber, wie wir schon früher erwähnt haben, diese Resultate noch nicht für einen genügenden Beweis der lipoiden Beschaffenheit des Lysinogens<sup>4)</sup>.

Eine kurze Versuchsreihe machten wir mit den verschiedenen von uns gewonnenen Pferdeimmunseren zu dem Zwecke, um nachzusehen, ob etwa in einem Falle ein Serum mit verringerter Spezifität entstanden wäre. Wir untersuchten deshalb die inaktivierten Sera nach Zusatz von Meerschweinchenkomplement auf Hämolyse von Hammelblut, konnten uns aber davon nicht überzeugen, daß bei einer der von uns verwendeten Antigenmodifikationen das Verhalten sich von dem der gewöhnlichen mit Blut hergestelltes Immunsera wesentlich unterschieden hatte.

### Zusammenfassung.

1) Die Untersuchung verschiedener auf Blut wirkender Immunsbstanzen mit Hilfe der Absorption durch unveränderte und auf 100° erhitzte Blutstromata zeigt beträchtliche

1) Centralbl. f. Bakt., Bd. 40, 1905, p. 151; Hofm. Beitr., Bd. 8. 1906, p. 238.

2) l. c.

3) Vgl. Bulloch, Transc. Path. Soc. London, Bd. 54, 1903, p. 258.

4) Siehe Dautwitz und Landsteiner, l. c.; Landsteiner, Jahresbericht f. Immunitätsf., Bd. 6, 209.

Unterschiede in dem Verhalten der einzelnen Stoffe, die wahrscheinlich für die Art ihrer Bindung charakteristisch sind. So wird das Bindungsvermögen der Stromata durch Kochen für Arachnolysin vollständig aufgehoben, für Pflanzenagglutinine kaum vermindert. Ein Unterschied besteht auch zwischen normalen und Immunagglutininen insofern, als das Bindungsvermögen für Immunagglutinine und Immunlysine stärker beeinflußt wurde als für Normalagglutinine.

2) Das Bindungsvermögen gekochter Stromata für Immunlysine und -agglutinine ist nicht vollständig aufgehoben, und schon aus diesem Grunde liegt hier nicht, wie angenommen wurde, ein Fall vor, in dem ein Antigen nach völligem Verlust seines Bindungsvermögens die immunisierende Wirkung beibehält. Ein Gegensatz besteht um so weniger, als aus einem homologen, i. e. durch Injektionen von erhitzten Stromata hergestellten Immunserum die Lysine und Agglutinine durch erhitzte Stromata sehr gut gebunden werden, entsprechend der von Obermayer und Pick beschriebenen Zustandsspezifität der Coctopräzipitine.

3) Nach Kochen der Stromata, Behandlung mit Aether und Alkohol, oder mit Formaldehyd blieb außer einem Teile des Bindungsvermögens auch die Fähigkeit erhalten, artspezifische Immunkörper hervorzurufen. Immunsera, zu deren Herstellung mit Aether und Alkohol extrahierte Stromata verwendet wurden, hatten im Vergleich zu gewöhnlichen Immunseren ziemlich geringe Lysinwirkung, durch Injektion von Aetherextrakten erzeugte Immunsera zeigten hingegen niedrige Agglutininwerte.

# Zeitschrift f. Immunitätsforschung. Originala. Bd. XIII. No. 5.

*Nachdruck verboten.*

[Aus dem Hygienischen Institute der Königl. Tierärztl. Hochschule zu Berlin (Vorstand: Geh. Med.-Rat Prof. Dr. Frosch).]

## **Beitrag zur Frage der bakteriziden Eigenschaften entzündlicher Exsudate.**

Von Dr. **Hans Rastaedt**, Tierarzt.

(Eingegangen bei der Redaktion am 4. Februar 1912.)

Die Frage nach dem bakteriziden Vermögen seröser Exsudate war bisher noch nicht genügend geklärt.

Manche Autoren, z. B. Haegler (1), Riedel (2), Moskowicz (3) und Sprengel (4), sehen in dem serösen Exsudat, das sich im Beginn einer Peritonitis in der Bauchhöhle ansammelt, ein Schutzorgan des Organismus gegen eingedrungene Bakterien, ohne allerdings diese Ansicht experimentell zu stützen. Im Gegensatz hierzu stehen die Untersuchungen der Forscher, die sich mit dem bakteriziden Vermögen der leukocytenarmen Peritonealfüssigkeit speziell beschäftigt haben, indem stets das bakterizide Vermögen dieser Flüssigkeiten nur unbedeutend war. Tietze (5) untersuchte die bakterizide Kraft des Bruchwassers und beobachtete stets, daß die bakterientötende Fähigkeit desselben nur gering war. Er sagt weiter: „Wurde im Experiment eine etwas zu große Menge einer Bakterienaufschwemmung (Staphylokokken) verwandt, so fand in den damit beschickten Serumröhrchen keine Verminderung der Keime statt, sondern im Gegenteil regelmäßig eine ausgesprochene Vermehrung derselben.“

Neuerdings hat Schrader (6) durch umfangreiche Experimente das bakterizide Verhalten des peritonealen Transsudates nachgeprüft. Er erzeugte durch intraperitoneale Injektion von Glyzerin bei Kaninchen große Mengen von Transsudat und beschickte das gleich aus der Bauchhöhle in sterile Röhrchen pipettierte Transsudat mit Colibakterien und Staphylokokken. Er fand nun, daß dem Transsudate eine starke bakterizide Kraft nicht zuzukommen scheint, da sich die Bakterien in dem Transsudate stets weiterentwickelt hatten, allerdings nicht so typisch und so reichlich wie auf Agar oder in Bouillon.

Diese sich widersprechenden Ansichten finden wohl ihre Erklärung in der Tatsache, daß die von Tietze und Schrader untersuchten Flüssigkeiten nur Stauungstranssudate waren, in denen a priori eine Anhäufung von bakterienfeindlichen Schutzstoffen nicht zu erwarten war. Es war vielmehr erforderlich, mit entzündlichen Exsudaten diese Frage zu klären.

In letzter Zeit hat nun S. Weil (7) nach dieser Richtung hin Versuche angestellt. Er erzeugte durch intrapleurale Injektion von Terpentinöl bei Meerschweinchen, Kaninchen und Hunden sterile, entzündliche, leukocytenarme Exsudate und prüfte ihr bakterizides Vermögen gegenüber dem Colibacillus, dem Bac. prodigiosus, dem Staphylococcus pyogenes aureus und dem Streptococcus pyogenes. Das Terpentinölexsudat des Kaninchens und des Hundes erwies sich für Colibacillen stark bakterizid, nicht aber das Exsudat des Meerschweinchens. Prodigiosus, Staphylococcus pyogenes aureus und Streptococcus pyogenes wurden vom Hundeexsudat ebenfalls abgetötet. Das Exsudat zeigte stärkeres bakterizides Vermögen als das Blutserum desselben Tieres. Das von den Leukocyten durch Zentrifugieren befreite Exsudat wirkte ebenso wie das leukocytenhaltige. Nach 20-stündigem Aufbewahren bei Zimmertemperatur oder im Eisschrank verlor das Exsudat seine Kraft; ebenso ging bei einstündigem Erwärmen auf 54° die Wirkung verloren. Das Exsudat aus der rechten Pleurahöhle, in die das Terpentinöl direkt eingespritzt war, erwies sich bei Kaninchen als stärker bakterizid als das aus der linken Pleurahöhle, in die das Terpentinöl diffundiert war. Die Dauer des Bestehens des Exsudates war ohne Einfluß auf die Wirkung. Weil gelangte auf Grund seiner Versuche zu der Auffassung, daß dem entzündlichen, serösen, leukocytenarmen Exsudate eine beträchtliche bakterienfeindliche Wirkung zukomme.

Auf Anregung von Herrn Geheimrat Frosch unternahm ich es, die Frage nach dem bakteriziden Vermögen des serösen, entzündlichen Exsudates weiterhin zu prüfen.

#### Eigene Versuche.

Um ein steriles, entzündliches und leukocytenarmes Exsudat zu erhalten, wandte ich das schon von Weil (7) benutzte Verfahren an. Als Versuchstiere dienten Hunde, Kaninchen und Meerschweinchen. Den meist mittelgroßen Hunden wurden unter aseptischen Vorsichtsmaßregeln 1—2 ccm Terpentinöl in die rechte Brusthöhle mittelst stumpfer Kanüle eingespritzt. Die Exsudatbildung ging nun rasch vor sich, wie ich durch tägliche Perkussion feststellte. Sie erreichte am 3. Tage den Höhepunkt, um vom 4. Tage nach der In-

jektion zurückzugehen. Das Exsudat aus der rechten Brusthöhle wurde meist am 3. Tage mittelst einfacher Punktion entnommen. Das Exsudat war immer in reichlicher Menge vorhanden. Es war hellgelb und etwas trübe, manchmal durch die Anwesenheit von roten Blutkörperchen rötlich gefärbt, vollkommen steril, wie die Kontrollversuche zeigten, und enthielt nur wenige Leukocyten. Der Geruch des Terpentinöls war in dem Exsudat bis zum 4. Tage wahrzunehmen, später nicht mehr.

Von Kaninchen ließen sich auf dieselbe Weise durch intrapleurale Injektion von 0,5–0,75 ccm Terpentinöl 10–20 ccm Exsudat gewinnen, von Meerschweinchen durch Injektion von 0,3–0,4 ccm Terpentinöl 5–10 ccm Exsudat. Da diese Tiere in wenigen Tagen unter Erscheinungen schwerer Atemnot starben, wurden sie gewöhnlich 48 Stunden nach der Injektion zur Gewinnung des Exsudates durch Verbluten getötet. Bei der steril vorgenommenen Eröffnung der Brusthöhle zeigte sich nicht nur im rechten, sondern auch im linken Pleurasack eine Flüssigkeitsansammlung, die von derselben Beschaffenheit war wie das Exsudat im rechten Pleurasack. Dieses linksseitige Exsudat führe ich mit Weil auf eine Diffusion des Terpentinöls zurück.

Um die sehr lästige Gerinnung des Exsudates zu verhindern, wurde es mittelst paraffinierter Pipetten aus der Brusthöhle entnommen und in paraffinierte Reagenzgläser gefüllt. Beim Hunde ließ ich direkt aus der Brusthöhle das Exsudat in ein paraffiniertes Reagenzglas laufen. Von einer 24-stündigen Bakterienagarkultur<sup>1)</sup> wurde jedesmal eine Normalöse (2 mg) in 15 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und von dieser Aufschwemmung 1 ccm zu 15 ccm Exsudat zugesetzt, zu weniger reichlichem Exsudate, z. B. bei Kaninchen und Meerschweinchen, entsprechend weniger Bakterien. Exsudat und Bakterien wurden durch Schütteln gut verteilt, dann wurde sofort 1 ccm der Mischung zu einer auf 42° erwärmten Agarlösung zugesetzt und der Agar zur Platte gegossen. Das Exsudat mit den Bakterien kam in den Brutschrank von 37° und wurde öfters umgeschüttelt. Nach 2, 4, 6 Stunden und später wurden nun Platten gegossen. Die

1) Alle Bakterien wurden Laboratoriumsstämmen entnommen.

Kolonien wurden nach 24 Stunden gezählt, nach 48 Stunden abermals, um die Zahl der später aufgegangenen Kolonien nicht zu vernachlässigen.

Bei dieser Versuchsanordnung ließ sich jedoch die Gerinnung des Exsudates nie vollständig verhindern. Es bildete sich immer im Meerschweinchenexsudate ein etwa linsengroßes, im Kaninchenextrakte ein erbsengroßes und im Hundeexsudate ein bohngroßes lockeres Koagulum, das am Ende jedes Versuches mehrmals in Kochsalzlösung gewaschen, zwischen zwei sterilen Skalpellen in einer sterilen Petrischale möglichst fein zerrieben und dann zu Agarplatten verarbeitet wurde. Da die Menge des Gerinnsels sich nur schätzungsweise bestimmen ließ, war das entsprechende Resultat stets ungenau. Um diesen Fehler möglichst klein zu gestalten, wurden die Zahlen für die im Gerinnsel enthaltenen Bakterien möglichst hoch angesetzt.

#### 1. Versuch.

Meerschweinchen. 0,3 ccm Terpentinöl. 4,5 ccm gelbliches, leicht getrübbtes seröses Exsudat aus beiden Pleurahöhlen + 0,3 ccm einer Aufschwemmung von *B. coli*.

Kolonienzahl		
sofort	nach 5 Std.	nach 6 Std. im Gerinnsel
$\infty$ <sup>1)</sup>	729	ca. 650

#### 2. Versuch.

Meerschweinchen. 0,3 ccm Terpentinöl. 4 ccm seröses Exsudat aus beiden Pleurahöhlen + 0,25 ccm *B. coli*.

Kolonienzahl		
sofort	nach 5 Std.	nach 6 Std. im Gerinnsel
$\infty$	604	ca. 670

#### 3. Versuch.

Meerschweinchen. 0,3 ccm Terpentinöl. 5 ccm rötlich gefärbtes Exsudat (serös-hämorrhagisch) aus beiden Pleurahöhlen + 0,33 ccm *B. coli*.

Kolonienzahl		
sofort	nach 5 Std.	nach 6 Std. im Gerinnsel
$\infty$	354	ca. 580

1)  $\infty$  bedeutet: wenigstens 500 000.

## 4. Versuch.

Sehr großes Meerschweinchen. 0,4 ccm Terpentinöl. 9 ccm seröses Exsudat aus beiden Pleurahöhlen. Davon werden 5 ccm unverändert zu 0,33 ccm B. coli zugesetzt, 4 ccm 1 Stunde auf 55° erwärmt. Beim Erwärmen schmilzt das Paraffin in dem Röhrchen und hebt sich infolge seines geringeren Gewichtes auf die Oberfläche des Exsudates. Das im Exsudat enthaltene Gerinnsel setzt sich am Boden des Reagenzglases ab. Die auf der Oberfläche des Exsudates erstarrte Paraffinschicht wird nun mit einem sterilen Glasstab entfernt und die überstehende, hellgelbe, fast klare Flüssigkeit abgegossen. Die Versuche mit erhitztem Exsudat wurden sämtlich ohne das störende Gerinnsel vorgenommen.

- a) 5 ccm unverändertes Exsudat + 0,33 ccm B. coli  
 b) 4 „ erhitztes „ + 0,25 „ „ „

	Kolonienzahl				
	sofort	nach 2 Std.	nach 5 Std.	nach 7 Std.	nach 8 Std. im Gerinnsel
a.	∞	27 000	1270	539	ca. 760
b.	∞	∞	∞	∞	—

Das Terpentinöl des Meerschweinchens hat also gegenüber den Colibakterien eine starke bakterizide Wirkung gezeigt. Dieses Resultat steht im Gegensatz zu dem von Weil, der kein bakterizides Vermögen des Meerschweinchenexsudates feststellen konnte. Dieser Unterschied trotz gleicher Versuchsanordnung ist wohl auf die Verschiedenheit der einzelnen zur Coligruppe gehörigen Bakterienarten zurückzuführen.

## 5. Versuch.

Kaninchen. 0,6 ccm Terpentinöl. In der rechten Pleurahöhle 12 ccm gelbliches, etwas trübes, steriles Exsudat, in der linken 1,5 ccm von derselben Flüssigkeit.

12 ccm seröses Exsudat + 0,8 ccm B. coli.

Kolonienzahl		
sofort	nach 4 Std.	nach 5 Std. im Gerinnsel
64 000	300	ca. 1360

## 6. Versuch.

Kaninchen. 0,6 ccm Terpentinöl. In der rechten Pleurahöhle 12 ccm rötlich gefärbtes Exsudat, in der linken 2 ccm.

12 ccm Exsudat + 0,8 ccm B. coli.

Kolonienzahl				
sofort	nach 1 Std.	nach 2 Std.	nach 4 Std.	nach 5 Std. im Gerinnsel
84 000	5070	3640	200	ca. 190

## 7. Versuch.

Kaninchen. 0,6 ccm Terpentinöl intrapleurale. Dieses Kaninchen starb unerwarteterweise schon nach 28 Stunden, und ich konnte erst ungefähr 3 Stunden nach dem Tode das Exsudat entnehmen. Es war von gelblicher Farbe, trübe und vollkommen steril.

10 ccm Exsudat + 0,66 ccm B. coli.

Kolonienzahl					
sofort	nach 1 Std.	nach 4 Std.	nach 18 Std.	nach 24 Std.	nach 25 Std. im Gerinnsel
42 000	572	112	0	0	ca. 26

Wie diese Versuche zeigen, übt auch das Terpentinölexsudat von Kaninchen auf Colibakterien eine starke bakterizide Wirkung aus, die sogar einige Stunden nach dem Tode anhält. Nunmehr suchte ich festzustellen, wie sich die bakterientötende Kraft des Exsudates zu der des Blutserums verhält.

## 8. Versuch.

Kaninchen. 0,6 ccm Terpentinöl. Nach 48 Stunden wird das Tier durch Verbluten getötet, das Blut zu Serum verarbeitet. In der rechten Pleurahöhle 10 ccm rötlich gefärbtes, trübes, steriles Exsudat, in der linken 1 ccm von derselben Flüssigkeit.

a) 10 ccm Exsudat + 0,66 ccm B. coli

b) 10 „ Blutserum + 0,66 „ „ „

	Kolonienzahl			
	sofort	nach 2 Std.	nach 4 Std.	nach 5 Std. im Gerinnsel
a.	∞	225	16	ca. 30
b.	∞	3000	500	—

## 9. Versuch.

Kaninchen. 0,6 ccm Terpentinöl. Nach 48 Stunden wird das Tier durch Verbluten getötet, das Blut zu Serum verarbeitet. In der rechten Pleurahöhle 12 cm seröses, keimfreies Exsudat, in der linken 2 ccm. Von dem rechtsseitigen Exsudate werden 6 ccm 1 Stunde auf 55° erhitzt und abgegossen.

a) 6 ccm Exsudat + 0,4 ccm B. coli

b) 6 „ „ erhitzt + 0,4 „ „ „

c) 6 „ Blutserum + 0,4 „ „ „

	Kolonienzahl				
	sofort	nach 4 Std.	nach 6 Std.	nach 24 Std.	nach 25 Std. im Gerinnsel
a.	167 500	440	14	2	0
b.	211 600	300 000	∞	∞	—
c.	276 000	560	27	37 000	—



## 10. Versuch.

Großes Kaninchen. 0,75 ccm Terpentinöl. 48 Stunden später wird das Tier durch Verbluten getötet, das Blut zu Serum verarbeitet. In der rechten Pleurahöhle 15 ccm seröses, trübes Exsudat, in der linken 5 ccm derselben Flüssigkeit. Von dem rechtsseitigen Exsudat wird die Hälfte 1 Stunde auf 55° erwärmt und abgegossen, ebenso wird ein Teil des Blutserums erwärmt.

a) 7,5 ccm rechtsseitiges Exsudat	+ 0,5 ccm B. coli
b) 7,5 " " " erhitzt	+ 0,5 " " "
c) 5,0 " linksseitiges " "	+ 0,33 " " "
d) 7,5 " Blutserum " "	+ 0,5 " " "
e) 7,5 " " erhitzt	+ 0,5 " " "

	Kolonienzahl		
	sofort	nach 4 Std.	nach 5 Std. im Gerinnsel
a.	46 000	213	ca. 270
b.	57 600	193 000	—
c.	50 500	226	ca. 310
d.	385 000	6 370	—
e.	276 000	∞	—

## 11. Versuch.

Großes Kaninchen. 0,75 ccm Terpentinöl. Nach 48 Stunden Tod durch Blutentziehung, Blut zu Serum verarbeitet. In der rechten Pleurahöhle 18 ccm gelbliches, trübes Exsudat, von dem die Hälfte 1 Stunde auf 55° erwärmt und dann abgegossen wird. In der linken Pleurahöhle 4 ccm seröses Exsudat.

a) 9 ccm rechtsseitiges Exsudat	+ 0,6 ccm B. coli
b) 9 " " " erhitzt	+ 0,6 " " "
c) 4 " linksseitiges " "	+ 0,27 " " "
d) 9 " Blutserum " "	+ 0,6 " " "
e) 9 " " erhitzt	+ 0,6 " " "

	Kolonienzahl					
	sofort	nach 2 Std.	nach 4 Std.	nach 6 Std.	nach 24 Std.	nach 25 Std. im Gerinnsel
a.	140 000	472	58	7	0	0
b.	187 000	235 000	460 000	∞	∞	—
c.	103 000	980	270	69	n. 7 Std. im Gerinnsel ca. 170	—
d.	320 000	4 100	479	66	178 000	—
e.	298 000	412 000	∞	∞	∞	—

## 12. Versuch.

Großes Kaninchen. 0,75 ccm Terpentinöl. Nach 48 Stunden Tod durch Verbluten, Blut zu Serum verarbeitet. In der rechten Pleurahöhle 15 ccm gelbliches seröses Exsudat, von dem die Hälfte 1 Stunde auf 55°

erwärmt und abgegossen wird. In der linken Pleurahöhle 6 ccm seröses Exsudat.

a)	7,5 ccm rechtsseitiges Exsudat	+ 0,5 ccm B. coli
b)	7,5 " " " erhitzt	+ 0,5 " " "
c)	6 " linksseitiges " "	+ 0,4 " " "
d)	7,5 " Blutserum	+ 0,5 " " "
e)	7,5 " " erhitzt	+ 0,5 " " "

	Kolonienzahl					
	sofort	nach 2 Std.	nach 4 Std.	nach 6 Std.	nach 24 Std.	nach 25 Std. im Gerinnsel
a.	160 700	448	52	10	3	ca. 10
b.	204 000	291 000	454 000	∞	∞	—
c.	168 000	960	248	31	9	ca. 18
d.	∞	95 000	2 100	450	125 000	—
e.	∞	∞	∞	∞	∞	—

Das Terpentinölexsudat des Kaninchens hat sich in den Versuchen 8—12 in seiner bakteriziden Wirksamkeit dem Serum stark überlegen gezeigt. Schon nach 2 Stunden, wie Versuch 11 und 12 beweisen, ist eine Differenz zugunsten des Exsudates bemerkbar. Am deutlichsten ist der Unterschied nach 24 Stunden, wobei im Exsudat alle oder fast alle Keime abgetötet worden sind, während im Serum nach anfänglicher Abtötung eine starke Vermehrung der Keime eingetreten ist. Ferner zeigen die Versuche, daß bei Kaninchen das Exsudat aus der rechten Pleurahöhle, in die das Terpentinöl direkt eingespritzt worden ist, stets stärker bakterientötend ist als das der linken Pleurahöhle, in die nur wenig Terpentinöl diffundiert ist. Bereits Weil hatte diese Tatsache festgestellt. Er ist der Ansicht: „Je ‚entzündlicher‘ das Exsudat ist, desto stärker scheint seine bakterizide Wirkung zu sein.“

Nach diesen ersten Versuchen erscheinen folgende Schlußfolgerungen berechtigt:

1) Ein durch Terpentinöl beim Kaninchen erzeugtes Pleuraexsudat zeigt dem Bacterium coli gegenüber eine stärkere bakterizide Wirkung als das Blutserum vom gleichen Tiere.

2) Die bakterizide Kraft des Exsudates wird ebenso wie die des Blutserums durch Erwärmen auf 55° zerstört.

Hier könnte man nun einwenden, daß bei der Abtötung der Keime das antiseptisch wirkende Terpentinöl in Betracht käme. Dies dürfte aber nicht der Fall sein. Das auf 55°

wärmte Exsudat hat sich als ein ebenso guter Nährboden erwiesen wie das erhitzte Serum, was nicht möglich sein könnte, wenn antiseptisch wirkende Verunreinigungen die bakterizide Wirkung des Exsudates veranlaßten. Es wäre schließlich noch denkbar, daß das Terpentinöl beim Erwärmen des Exsudates sich verflüchtigt habe, daß also im nicht erhitzten Exsudat trotzdem das Terpentinöl wirken könnte. Dieser Einwand wird jedoch durch meine späteren Versuche widerlegt.

Die höhere bakterizide Wirkung des Exsudates muß ihre Ursache in einer vom Serum verschiedenen Zusammensetzung haben. Reste der injizierten Flüssigkeit können hier kaum in Betracht kommen. Es kann nur ein vermehrter Gehalt an labilen Körpern die Ursache des erhöhten bakteriziden Vermögens sein.

Um nun jeden Zweifel über die Wirkung des Terpentinöls auszuschließen, stellte ich ferner Versuche mit Aleuronatexsudaten an, in denen ja kein antiseptisch wirkender Stoff vorhanden ist.

### 13. Versuch.

Einem großen Kaninchen werden 3 ccm Aleuronatbrei in die rechte Pleurahöhle injiziert. Nach 48 Stunden wird das Tier durch Verbluten getötet, das Blut zu Serum verarbeitet. In der rechten Pleurahöhle 12 ccm gelbliches, trübes Exsudat, in der linken 2 ccm. Auf den Pleuren befinden sich gelbliche, lockere Beläge. Beide Exsudate sind steril und stark leukocytenhaltig. Verarbeitung des Exsudates wie bei den vorigen Versuchen.

a) 6 ccm rechtsseitiges Exsudat	+ 0,4 ccm B. coli
b) 6 " " " " auf 55° erhitzt	+ 0,4 " " "
c) 6 " Blutserum " " " " auf 55° erhitzt	+ 0,4 " " "
d) 6 " " " " auf 55° erhitzt	+ 0,4 " " "

	Kolonienzahl					
	sofort	nach 2 Std.	nach 4 Std.	nach 6 Std.	nach 24 Std.	nach 25 Std. im Gerinnsel
a.	210 000	1 500	363	131	8	ca. 17
b.	380 000	∞	∞	∞	∞	—
c.	410 000	14 500	1700	366	25 100	—
d.	360 000	∞	∞	∞	∞	—

### 14. Versuch.

Großes Kaninchen. Injektion von 4 ccm Aleuronatbrei in die rechte Pleurahöhle. Nach 48 Stunden durch Verbluten getötet, Blut zur Serumgewinnung verarbeitet. In der rechten Pleurahöhle 10 ccm einer schwach rötlich gefärbten Flüssigkeit, gelbliche Beläge auf der Pleura in geringer

Menge. In der linken Pleurahöhle 2 ccm von der gleichen Flüssigkeit. Verarbeitung des stark leukocytenhaltigen, sterilen Exsudates wie gewöhnlich.

a) 5 ccm rechtsseitiges Exsudat	+ 0,33 ccm B. coli
b) 5 " " " auf 55° erhitzt	+ 0,33 " " "
c) 5 " Blutserum	+ 0,33 " " "
d) 5 " " auf 55° erhitzt	+ 0,33 " " "

	Kolonienzahl					
	sofort	nach 2 Std.	nach 4 Std.	nach 6 Std.	nach 24 Std.	nach 25 Std. im Gerinnsel
a.	280 000	1 620	584	175	29	ca. 22
b.	363 000	∞	∞	∞	∞	—
c.	421 000	14 700	1873	459	∞	—
d.	460 000	∞	∞	∞	∞	—

Diese Versuche, die sich in der Technik an die von Buchner (8), Schuster (9) und Hahn (10) anschlossen, zeigen das gleiche Ergebnis wie die Versuche jener Forscher. Die bakterizide Wirksamkeit des leukocytenreichen Exsudates ist dem Serum überlegen. Ein Vergleich mit den Ergebnissen des Terpentinölexsudates läßt einen bedeutenden Unterschied in der Wirksamkeit beider Exsudate nicht erkennen. Daraus darf man schließen, daß die bakterizide Kraft dem entzündlichen Exsudat als solchem zukommt.

#### 15. Versuch.

Einem mittelgroßen Hunde werden 1,5 ccm Terpentinöl in die rechte Pleurahöhle injiziert. Am 3. und 5. Tage wird das Exsudat mittelst Punktion entnommen. Es läuft direkt aus der Brusthöhle in paraffinierte und abgeteilte Reagenzgläser. Das Exsudat ist eine gelblich-trübe, leukocytenarme Flüssigkeit und völlig keimfrei. Das Blut wird aus der Vena femoralis entnommen und zu Serum verarbeitet.

a) 15 ccm Exsudat vom 3. Tage	+ 1,0 ccm B. coli
b) 15 " " " 3. " erhitzt	+ 1,0 " " "
c) 9 " " " 5. " "	+ 0,6 " " "
d) 15 " Blutserum	+ 1,0 " " "
e) 15 " " erhitzt	+ 1,0 " " "

	Kolonienzahl						
	sofort	nach 1 Std.	nach 3 Std.	nach 5 Std.	nach 7 Std.	nach 24 Std.	nach 25 Std. im Gerinnsel
a.	∞	141 000	3280	1430	680	19	ca. 35
b.	∞	∞	∞	∞	∞	∞	—
c.	∞	134 000	4100	1510	720	27	ca. 30
d.	∞	160 000	18 000	5340	951	150 000	—
e.	∞	∞	∞	∞	∞	∞	—

Colibakterien werden also vom Exsudat des Hundes ebenfalls stark abgetötet. Die Wirksamkeit des Blutserums ist auch beim Hunde schwächer als die des Exsudates. Das Exsudat ist beim Hunde nach 8 Tagen verschwunden. Sein Alter ist bis zu 5 Tagen ohne Einfluß auf das bakterizide Vermögen. Das Exsudat vom 5. Tage, das schon in der Rückbildung begriffen ist, ist ebenso wirksam wie das vom 3. Tage, das auf der Höhe der Pleuritis gebildet worden ist.

Beim Hunde habe ich nie eine Diffusion des Terpentinöls von der rechten Pleurahöhle in die linke feststellen können. Im linken Pleurasack fand sich niemals eine Spur von Exsudat.

#### 16. Versuch.

Alle Exsudatproben stammen von demselben Hunde wie die zum 15. Versuch benutzten. Die Proben werden 24 Stunden teils bei Zimmertemperatur, teils im Eisschrank aufbewahrt. Das Gerinnsel hat sich abgesetzt und wird abgegossen. Ein anderer Teil der Proben wird  $\frac{1}{2}$  Stunde zentrifugiert, die überstehende hellgelbe, fast klare Flüssigkeit abgegossen.

a)	9 ccm Exsudat	unverändert	+ 0,6 ccm B. coli
b)	9 "	24 Stunden bei Zimmertemperatur	+ 0,6 " " "
c)	9 "	24 " im Eisschrank	+ 0,6 " " "
d)	9 "	$\frac{1}{2}$ Stunde zentrifugiert	+ 0,6 " " "

	Kolonienzahl						
	sofort	nach 1 Std.	nach 3 Std.	nach 5 Std.	nach 7 Std.	nach 24 Std.	nach 25 Std. im Gerinnsel
a.	$\infty$	138 000	8 300	2 160	770	25	ca. 40
b.	$\infty$	381 000	174 000	35 200	7350	256 000	—
c.	$\infty$	372 000	158 000	29 800	4260	169 000	—
d.	$\infty$	139 000	61 000	12 000	1730	368	—

Wie dieser Versuch zeigt, büßt das Exsudat, das den Tierkörper verlassen hat, allmählich seine Wirksamkeit ein. Diese Tatsache stimmt mit dem Verhalten des Blutserums überein, das ebenfalls außerhalb des Tierkörpers seine bakteriziden Eigenschaften nach einiger Zeit verliert, wie Nissen (11), Buchner (12), Stern (13) u. a. nachgewiesen haben. Exsudat, aus dem die Leukocyten durch Zentrifugieren entfernt worden sind, hat nach diesem Versuche, sowie den späteren eine weit schwächere Wirkung als das leukocytenhaltige Exsudat. In diesem Punkte weicht mein Resultat ebenfalls von dem Weils ab.

Nunmehr versuchte ich die Wirksamkeit des Exsudates auch anderen Bakterien gegenüber festzustellen und wählte zunächst den *Bacillus prodigiosus*.

### 17. Versuch.

Mittelgroßer Hund. 1,5 ccm Terpentinöl intrapleural. Entnahme des Exsudates und des Blutes wie im 15. Versuch. Das Exsudat ist infolge Beimengung von roten Blutkörperchen rötlich gefärbt.

a)	10 ccm Exsudat vom 3. Tage	+ 0,66 ccm B. prodig.
b)	10 „ „ „ 3. „ erhitzt	+ 0,66 „ „ „
c)	10 „ „ „ 5. „	+ 0,66 „ „ „
d)	10 „ Blutserum	+ 0,66 „ „ „
e)	10 „ „ erhitzt	+ 0,66 „ „ „

	Kolonienzahl						
	sofort	nach 1 Std.	nach 3 Std.	nach 5 Std.	nach 7 Std.	nach 24 Std.	nach 25 Std. im Gerinnsel
a.	∞	134 000	12 200	3 610	760	39	ca. 50
b.	∞	∞	∞	∞	∞	∞	—
c.	∞	127 000	10 800	3 170	693	42	ca. 36
d.	∞	∞	168 000	43 000	9120	148 000	—
e.	∞	∞	∞	∞	∞	∞	—

Der Versuch ist in seinen Ergebnissen fast gleich dem 15. Versuche verlaufen. Nur scheint das Hundeserum auf den *Prodigiosus* eine noch schwächere Wirkung auszuüben als auf das *Bacterium coli*.

### 18. Versuch.

Das Exsudat stammte von demselben Tiere wie in Versuch 17. Die Proben werden 24 Stunden teils im Zimmer, teils im Eisschrank aufbewahrt. Das Gerinnsel hat sich abgesetzt und wird entfernt. Ein anderer Teil der Proben wird  $\frac{1}{2}$  Stunde zentrifugiert, die überstehende Flüssigkeit abgegossen.

a)	10 ccm Exsudat unverändert	+ 0,66 ccm B. prodig.
b)	10 „ „ 24 Stunden im Zimmer	+ 0,66 „ „ „
c)	10 „ „ 24 „ „ Eisschrank	+ 0,66 „ „ „
d)	10 „ „ $\frac{1}{2}$ Stunde zentrifugiert	+ 0,66 „ „ „

	Kolonienzahl						
	sofort	nach 1 Std.	nach 3 Std.	nach 5 Std.	nach 7 Std.	nach 24 Std.	nach 25 Std. im Gerinnsel
a.	∞	136 000	9 250	2 740	812	31	ca. 22
b.	∞	353 000	209 000	38 000	7800	127 000	—
c.	∞	∞	270 000	72 000	8430	176 000	—
d.	∞	144 000	65 800	13 500	3140	665	—

Auch dieser Versuch gleicht seinem Analogon Versuch 16. Das zentrifugierte Exsudat ist auch dem Prodigiosus gegenüber erheblich schwächer als das unveränderte. Die Leukocyten scheinen also bei der bakteriziden Wirkung des Exsudates eine gewisse Rolle zu spielen.

Besonderes Interesse mußte es erregen, zu sehen, wie es sich mit der abtötenden Wirkung des Exsudates den Mikroorganismen gegenüber verhält, auf die das Blutserum nicht schädigend einzuwirken vermag, z. B. gegenüber Staphylokokken und Streptokokken.

In einem Vorversuche hatte ich bereits festgestellt, daß bei der gewöhnlichen Aussaatmenge (15 ccm Exsudat + 1 ccm Bakterienaufschwemmung) die bakterizide Wirkung des Exsudates auf Staphylokokken gleich Null ist. Ich versuchte es nun im nächsten Versuche mit der halben Aussaatmenge.

#### 19. Versuch.

Mittelgroßer Hund. 2 ccm Terpentinöl intrapleural. Entnahme und Verarbeitung des Exsudates und Blutes wie oben. Das Exsudat ist hellgelb, leukocytenarm und keimfrei. Aussaat in halber Menge: *Staphylococcus pyogenes aureus*.

a)	15 ccm Exsudat	unverändert	+ 0,5 ccm St. pyog. a.
b)	15 "	erhitzt	+ 0,5 " " " "
c)	10 "	zentrifugiert	+ 0,33 " " " "
d)	10 " Blutserum		+ 0,33 " " " "
e)	10 "	erhitzt	+ 0,33 " " " "

	Kolonienzahl						
	sofort	nach 1 Std.	nach 3 Std.	nach 5 Std.	nach 7 Std.	nach 24 Std.	nach 25 Std. im Gerinnsel
a.	∞	220 000	65 000	15 000	1160	187 000	223 000
b.	∞	∞	∞	∞	∞	∞	—
c.	∞	∞	∞	240 000	112 000	∞	—
d.	∞	∞	∞	∞	∞	∞	—
e.	∞	∞	∞	∞	∞	∞	—

Trotz Verringerung der Aussaatmenge erweist sich das Hundeexsudat dem *Staphylococcus pyogenes aureus* gegenüber nur schwach wirksam. Auffallend ist, daß das zentrifugierte Exsudat nur noch eine äußerst geringe Wirkung hat, während das Serum, wie bereits bekannt, den *Staphylococcus pyogenes aureus* gar nicht abtötet. Weil dagegen hat ziemlich starke Bakterizidie diesem Mikroorganismus gegenüber beobachtet.

Dieses ungleiche Ergebnis erklärt sich wohl aus der Verschiedenheit der Virulenz der Staphylokokken. Immerhin ist es bemerkenswert, daß das Exsudat des Hundes virulente Keime abtötet, die in seinem Blutserum ungehindert wachsen und sich vermehren können.

#### 20. Versuch.

Exsudat und Blut stammen von demselben Hunde wie in Versuch 19. Verarbeitung des Exsudates und Blutes wie sonst. Aussaat in halber Menge: Streptococcus equi.

a)	10 ccm	Exsudat unverändert	+ 0,33 ccm	Str. equi
b)	10 "	" erhitzt	+ 0,33 "	" "
c)	10 "	" zentrifugiert	+ 0,33 "	" "
d)	10 "	Blutserum	+ 0,33 "	" "
e)	10 "	" erhitzt	+ 0,33 "	" "

	Kolonienzahl						
	sofort	nach 1 Std.	nach 3 Std.	nach 5 Std.	nach 7 Std.	nach 24 Std.	nach 25 Std. im Gerinnsel
a.	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞
b.	∞	∞	∞	∞	∞	∞	—
c.	∞	∞	∞	∞	∞	∞	—
d.	∞	∞	∞	∞	∞	∞	—
e.	∞	∞	∞	∞	∞	∞	—

Das Exsudat des Hundes hat gegenüber dem Streptococcus equi völlig versagt. Weil wiederum hat mit dem Hundeexsudat einen für den Menschen höchst virulenten Stamm von Streptococcus pyogenes stark abgetötet. Der Unterschied im Erfolg ist vielleicht in den Stammesverschiedenheiten der Streptokokken zu suchen.

Ich untersuchte nun weiter die Frage, ob es nicht möglich wäre, Exsudat, dessen bakterizides Vermögen durch Erhitzen vernichtet ist, zu „reaktivieren“. Ich wählte zunächst einen Zusatz von frischem Exsudat.

#### 21. Versuch.

Großes Kaninchen. 0,75 ccm Terpentinöl in die rechte Pleurahöhle. Nach 48 Stunden Tod durch Verbluten, Blut zu Serum verarbeitet. In der rechten Pleurahöhle 20 ccm seröses, etwas trübes Exsudat, in der linken 5 ccm. Zu einem Teil des 1 Stunde auf 55° erhitzten (inaktivierten) Exsudates wird 0,5 ccm frisches Exsudat hinzugefügt.



a)	6 ccm rechtsseitiges Exsudat unverändert	+ 0,4 ccm B. coli
b)	6 " " " inaktiviert	+ 0,4 " " "
c)	6 " " " + 0,5 ccm frisches Exsudat	+ 0,4 " " "
d)	5 " linksseitiges Exsudat unverändert	+ 0,33 " " "
e)	6 " Blutserum	+ 0,4 " " "
f)	6 " " erhitzt	+ 0,4 " " "

	Kolonienzahl					
	sofort	nach 2 Std.	nach 4 Std.	nach 6 Std.	nach 24 Std.	nach 25 Std. im Gerinnsel
a.	326 000	1180	204	9	0	0
b.	379 000	∞	∞	∞	∞	—
c.	287 000	943	371	18	1	—
d.	291 000	1370	446	27	0	0
e.	392 000	9500	2270	684	47 300	—
f.	347 000	∞	∞	∞	∞	—

Es gelingt also, das inaktivierte Exsudat durch Zusatz von frischem Exsudat zu reaktivieren.

Nach meinen früheren Versuchen mit zentrifugiertem Exsudat, aus dem die Leukocyten entfernt waren, durfte ich annehmen, daß bei der Bakterizidie die Leukocyten in gewissem Grade beteiligt sind. Es lag daher nahe, zu versuchen, ob sich das inaktivierte Exsudat durch Leukocyten oder Leukocytenextrakte reaktivieren lasse. In dieser Absicht ist der folgende Versuch unternommen worden.

## 22. Versuch.

Großes Kaninchen (A). 0,75 ccm Terpentinöl intrapleural. Nach 48 Stunden durch Verbluten getötet, Blut zu Serum verarbeitet. In der rechten Pleurahöhle 20 ccm seröses, leukocytenarmes, steriles Exsudat, in der linken 5 ccm. 15 ccm vom rechtsseitigen Exsudat werden 1 Stunde auf 55° erhitzt (inaktiviert) und abgegossen.

Großes Kaninchen (B). 3,5 ccm Aleuronatbrei intrapleural. Nach 48 Stunden getötet. In der rechten Pleurahöhle 3,5 ccm gelbliches, trübes, sehr leukocytenreiches, steriles Exsudat. Auf Lunge und Pleura dicke, gelbliche Schwarten, die nur locker aufliegen und fast nur aus Leukocyten bestehen, wie seinerzeit durch Untersuchungen von Schuster (9) und Hahn (10) gezeigt ist. In der linken Pleurahöhle nur 1 ccm Exsudat. 0,5 ccm Aleuronatexsudat wird  $\frac{1}{2}$  Stunde zentrifugiert. Der Bodensatz, der zumeist aus Leukocyten besteht, wird inaktiviertem Terpentinölexsudat zugesetzt. Die übrigen 3 ccm Aleuronatexsudat und einige Pleurabeläge werden  $\frac{1}{2}$  Stunde zentrifugiert. Der Bodensatz wird dreimal mit je 10 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt, 1 Stunde im Schüttelapparat geschüttelt und wieder zentrifugiert. Die überstehende, klare Flüssigkeit wird jedesmal abgegossen, so daß schließlich 30 ccm „Extrakt“

erhalten werden. Der Extrakt wird im Eisschrank aufbewahrt. Erst am nächsten Tage finden die bakteriziden Versuche mit dem Extrakte statt.

- a) 5 ccm rechtsseitiges Exsudat unverändert + 0,33 ccm B. coli  
 b) 5 " " " inaktiviert + 0,33 " " "  
 c) 5 " " " " + 0,5 ccm Aleuronatleukocyten + 0,33 " " "  
 d) 5 " rechtsseitiges Exsudat inaktiviert + 5 ccm Leukocytenextrakt + 0,33 " " "  
 e) 20 " Leukocytenextrakt + 0,2 " " "  
 f) 5 " linksseitiges Exsudat unverändert + 0,33 " " "  
 g) 5 " Blutserum + 0,33 " " "  
 h) 5 " " inaktiviert + 0,33 " " "  
 i) 5 " " " + 5 ccm Leukocytenextrakt + 0,33 " " "

	Kolonienzahl					
	sofort	nach 2 Std.	nach 4 Std.	nach 6 Std.	nach 24 Std.	nach 25 Std. im Gerinnsel
a.	374 000	1070	351	7	0	0
b.	389 000	∞	∞	∞	∞	—
c.	401 000	∞	∞	∞	∞	—
d.	∞	∞	∞	257 000	∞	—
e.	∞	∞	315 000	192 000	∞	—
f.	316 000	2890	527	25	2	0
g.	∞	8000	954	323	∞	—
h.	∞	∞	∞	∞	∞	—
i.	∞	∞	∞	∞	∞	—

Weder die Leukocyten noch der Leukocytenextrakt vermochten das inaktivierte Terpentinölexsudat und das Blutserum zu reaktivieren, wenn auch beim Extrakt ein ganz minimaler Erfolg nicht ausgeblieben ist. Dies ist darauf zurückzuführen, daß der Extrakt selbst eine nur schwache bakterizide Wirksamkeit besitzt, die ihrerseits wohl in der von mir gewählten Herstellungsweise ihren Grund haben kann.

Es gelingt indessen, mit anderen Methoden wirksame Leukocytenextrakte herzustellen. Das älteste Verfahren rührt von Buchner (8) her, der die aus Aleuronatexsudaten ausgeschleuderten und gewaschenen Leukocyten in physiologischer Kochsalzlösung einfrore und auftaute, dann einige Zeit lang bei Zimmertemperatur mazerierte. Schattenfroh (14) vervollkommnete diese Methode, indem er die Leukocyten 3—5mal mit physiologischer Kochsalzlösung wusch, ehe er sie den Extraktionsflüssigkeiten zusetzte. Bail (15) benutzte zur Extraktion der Leukocytenstoffe das von Van de Velde entdeckte „Leukozidin“, ein vom Staphylococcus pyogenes aureus

produziertes Gift, das die Leukocyten schnell abtötet. Er digerierte die Leukocyten mit dem verdünnten „Leukozidin“ 1 Stunde bei 37°. Van de Velde (16) benutzte außer dem „Leukozidin“ zur Extraktion der Leukocytenstoffe destilliertes Wasser und Hundeserum und konnte mit solchen Extrakten Staphylokokken völlig abtöten. Laschtschenko (17) wusch die aus Aleuronatexsudaten gewonnenen Leukocyten mit inaktivem Kaninchenserum oder physiologischer Kochsalzlösung und digerierte sie in verschiedenen Seris, z. B. in Pferde-, Rinder-, Hammelserum etc., bis zu 2 Stunden bei 37°. Schneider (18) gewann die Leukocytenstoffe durch Digestion in physiologischer Kochsalzlösung oder in 5-proz. Serumkochsalzlösung.

Nach den mißlungenen Versuchen mit Leukocyten und Leukocytenextrakten versuchte ich das erhitzte Exsudat des Kaninchens mit aktivem Blutserum zu reaktivieren. Ich nahm hierzu frisches Blutserum vom gleichen Tier und frisches Meerschweinchenserum.

### 23. Versuch.

Großes Kaninchen. 0,75 ccm Terpentinöl. Nach 48 Stunden wird das Tier verblutet, das Blut zu Serum verarbeitet. In der rechten Pleurahöhle 18 ccm seröses, trübes Exsudat, in der linken 5 ccm. Zu einem Teile des inaktivierten, rechtsseitigen Exsudates und des inaktivierten Blutserums wird 0,5 ccm frisches Blutserum von demselben Tiere hinzugefügt.

- a) 6 ccm rechtsseitiges Exsudat unverändert + 0,4 ccm B. coli  
 b) 6 „ „ „ inaktiviert + 0,4 „ „ „  
 c) 6 „ „ „ + 0,5 ccm frisches Blutserum + 0,4 „ „ „  
 d) 5 „ linksseitiges Exsudat unverändert + 0,33 „ „ „  
 e) 6 „ Blutserum + 0,4 „ „ „  
 f) 6 „ „ inaktiviert + 0,4 „ „ „  
 g) 6 „ „ + 0,5 ccm frisches Serum + 0,4 „ „ „

	Kolonienzahl					
	sofort	nach 2 Std.	nach 4 Std.	nach 6 Std.	nach 24 Std.	nach 25 Std. im Gerinnsel
a.	307 000	1 080	315	13	0	0
b.	352 000	∞	∞	∞	∞	—
c.	413 000	1 190	501	22	2	—
d.	371 000	1 360	568	31	4	1
e.	∞	11 200	2847	320	31 700	—
f.	∞	∞	∞	∞	∞	—
g.	∞	9 160	1940	237	55 600	—

## 24. Versuch.

Großes Kaninchen. 0,75 ccm Terpentinöl. Nach 48 Stunden durch Verbluten getötet, Blut zur Serumgewinnung verarbeitet. In der rechten Pleurahöhle 20 ccm seröses Exsudat, in der linken 5 ccm. Zu einem Teile des inaktivierten Exsudates und Blutserums wird 0,5 ccm frisches Meerschweinchenserum hinzugesetzt.

- a) 6 ccm rechtsseitiges Exsudat unverändert + 0,4 ccm B. coli  
 b) 6 " " " inaktiviert + 0,4 " " "  
 c) 6 " " " " + 0,5 ccm frisches Meerschweinchenserum + 0,4 " " "  
 d) 5 " linksseitiges Exsudat unverändert + 0,33 " " "  
 e) 6 " Blutserum + 0,4 " " "  
 f) 6 " " inaktiviert + 0,4 " " "  
 g) 6 " " " + 0,5 ccm frisches Meerschweinchenserum + 0,4 " " "

	Kolonienzahl					
	sofort	nach 2 Std.	nach 4 Std.	nach 6 Std.	nach 24 Std.	nach 25 Std. im Gerinnsel
a.	368 000	1 140	255	43	6	2
b.	423 000	∞	∞	∞	∞	—
c.	384 000	1 060	151	10	3	—
d.	334 000	3 170	743	168	11 500	ca. 250
e.	∞	14 800	1960	334	∞	—
f.	∞	∞	∞	∞	∞	—
g.	∞	12 100	1740	203	∞	—

Die Reaktivierung des erhitzten Exsudates mit frischem Kaninchen- und Meerschweinchenserum ist nach diesen Versuchen gut gelungen. Das reaktivierte Exsudat zeigt dieselbe starke bakterizide Wirkung wie das frische Exsudat. Diese Reaktivierungsversuche sind auch ein Beweis mehr dafür, daß bei der Bakterizidie kein antiseptisch wirkender Stoff in Betracht kommen kann, da ja das Serum kein Terpentinöl enthält.

Das inaktivierte Exsudat, das durch Serum seine bakterizide Wirksamkeit wiedererlangt, findet also in dem Serum ein geeignetes Komplement vor, das seinen bakteriziden Ambozeptor zu aktivieren vermag. Hiermit ist auch die komplexe Natur der Bakteriolyse (Alexine) des Exsudates nachgewiesen, wie sie Ehrlich und Morgenroth (19) für die Hämolysine, R. Pfeiffer (20), Moxter (21), Neisser und Wechsberg (22) für die Bakteriolyse des Serums haben dartun können.

### Zusammenfassung.

Fassen wir die Hauptergebnisse unserer Untersuchungen noch einmal kurz zusammen, so gelangen wir zu folgenden Schlüssen:

1) Das Terpinölexsudat vom Meerschweinchen und Kaninchen wirkt stark bakterizid auf *B. coli*, das vom Hund stark auf *B. coli* und *prodigiosus*, schwach auf *Staphylococcus pyogenes aureus*, gar nicht auf *Streptococcus equi*.

2) Die bakterizide Kraft des Exsudates ist größer als die des Blutserums.

3) Das eine Stunde auf 55° erwärmte Exsudat hat seine bakterizide Kraft verloren.

4) Das zentrifugierte Exsudat wirkt erheblich schwächer als das zellhaltige.

5) Das Exsudat büßt außerhalb des Tierkörpers seine Wirksamkeit allmählich ein.

6) Das durch Erwärmen inaktivierte Exsudat des Kaninchens erlangt seine bakterizide Fähigkeit wieder durch Zusatz von frischem Exsudat, frischem Kaninchen- oder Meerschweinchenserum.

7) Das Alter des Exsudates hat auf die bakterizide Kraft keinen Einfluß.

8) Das seröse Exsudat der Brust- und Bauchhöhle darf daher wohl als ein wertvolles Schutzmittel des Organismus gelten, mit dem er eingedrungene Bakterien zu bekämpfen imstande ist.

### Literaturverzeichnis.

- 1) Haegler, Centralbl. f. Chirurgie, Bd. 31, 1904, p. 282.
- 2) Riedel, Arch. f. klin. Chirurgie, Bd. 47, Jubiläumsschr. f. König, 1894, p. 153.
- 3) Moskowitz, Arch. f. klin. Chirurgie, Bd. 72, 1904, p. 773.
- 4) Sprengel, Appendicitis. Deutsche Chirurgie, Bd. 46 d, 1906.
- 5) Tietze, Mitteilungen aus den Grenzgebieten der Medizin und Chirurgie, Bd. 5, 1899, p. 15.
- 6) Schrader, Deutsche Zeitschr. f. Chirurgie, Bd. 70, 1903, p. 421.
- 7) Weil, S., Deutsche med. Wochenschr., 1911, p. 66.
- 8) Buchner, H., Münch. med. Wochenschr., 1894, p. 469, 495, 589, 717.
- 9) Schuster, Die Leukocyten in ihrer Beziehung zur bakteriziden Wirkung des Blutes. Inaug.-Diss., München 1894.
- 10) Hahn, Arch. f. Hygiene, Bd. 25, 1895, p. 105.

- 11) Nissen, Zeitschr. f. Hygiene, Bd. 6, 1889, p. 487.
- 12) Buchner, H., Arch. f. Hygiene, Bd. 10, 1890, p. 84, 101, 121, 149; Bd. 17, 1893, p. 112.
- 13) Stern, Zeitschr. f. klin. Med., Bd. 18, 1891, p. 46.
- 14) Schattenfroh, Arch. f. Hygiene, Bd. 31, 1898, p. 1; Bd. 35, 1899, p. 135.
- 15) Bail, Ebenda, Bd. 30, 1897, p. 348; Bd. 32, 1898, p. 133.
- 16) Van de Velde, Centralbl. f. Bakt., Abt. I, Bd. 23, 1898, p. 69.
- 17) Laschtschenko, Münchener med. Wochenschr., 1899, p. 475; Arch. f. Hygiene, Bd. 37, 1900, p. 290.
- 18) Schneider, Arch. f. Hygiene, Bd. 70, 1909, p. 40.
- 19) Ehrlich und Morgenroth, Berliner klin. Wochenschr., 1899, p. 6 u. 481; 1900, p. 453 u. 681.
- 20) Pfeiffer, R., Zeitschr. f. Hygiene, Bd. 20, 1895, p. 198.
- 21) Moxter, Centralbl. f. Bakt., Abt. I, Bd. 26, 1899, p. 344.
- 22) Neisser und Wechsberg, Münchener med. Wochenschr., 1901, p. 697.

---

*Nachdruck verboten.*

[Bacteriological Department of the Royal Institute of Public Health, London.]

### Sur la putréfaction intestinale.

#### II. Mémoire.

Par A. Distaso.

(Eingegangen bei der Redaktion am 29. Februar 1912.)

Dans la première partie de ce travail<sup>1)</sup> nous avons établi la marche microbienne de la putréfaction intestinale. Après nous être rendu compte des processus qui s'y accomplissent en présence des microbes qui se succèdent et désagrègent chacun à leur tour une partie des substances qui s'y trouvent, il était nécessaire pour pouvoir envisager les problèmes de la flore intestinale, de faire des expériences sur le mode de réaction de ces microbes vis-à-vis de certaines substances. Tout d'abord nous avons voulu expérimenter avec des substances qui habituellement ne se trouvent pas ou ne se trouvent seulement qu'en très petite quantité dans le gros

---

<sup>1)</sup> Centralbl. f. Bakt., Abt. I, Orig., Bd. 62, 1912.

intestin pour voir quels changements subit la flore en leur présence.

Nous avons également pris un morceau de cœcum et nous y avons injecté une solution à 2 % de nutrose qu'on emploie dans les laboratoires pour la préparation des milieux. La quantité de la solution injectée était égale à la capacité de la pièce. Après 24 heures, la quantité de gaz développée était telle que le morceau était extrêmement ballonné et paraissait vouloir éclater. La puanteur était horrible. La flore était formée de *Bac. coli*, de streptocoques, d'entérocoques, staphylocoques et de *Bac. perfringens* en grande quantité.

Dans une seconde expérience, nous avons pris un morceau de cœcum dans lequel nous avons injecté de la même manière 15 c. c. de peptone Chapoteau à la dilution de 2 %. La réaction est devenue extrêmement alcaline et le morceau dégageait une odeur horrible de putréfaction. Il était ballonné et semblait près d'éclater. La flore est la même que dans le témoin, son activité fermentative seule semble augmenter.

Dans un autre morceau, nous injectons une solution de glyocolle<sup>1)</sup> à 2 % en quantité égale à la capacité du morceau que nous mettons à putréfier. Le résultat est que la flore, dans ce morceau, reste la même que dans le morceau témoin et la putréfaction marche de la même manière.

Ce premier groupe d'expériences nous montre qu'à l'état normal les acides aminés se trouvent dans le gros intestin; tandis que les albumoses, les peptones et la caseine sont absents. Leur présence déterminerait une exaltation de l'activité biologique des microbes existants et la production de substances qui pourraient être dangereuses pour l'homme. L'observation sur l'effet de la nutrose sur la flore intestinale est spécialement intéressante, car elle nous explique la condition des enfants nourris au lait de vache.

Chez ces enfants, en effet, on note une flore très variable où le *Bac. coli*, le *Bac. perfringens* sont en grand nombre.

L'apport, par le lait, de caseine que l'organisme n'est pas capable de digérer et que renvoi dans le gros intestin, donne

---

1) Nous remercions notre ami le Dr. M. Nicolle de nous avoir voulu envoyer cette substance.

à ces microbes une exaltation et la formation de gaz qu'on note souvent chez ces sujets.

L'action de la peptone nous explique de la même manière cette activité de la flore intestinale dans les cas où ces substances sont mal digérées dans l'intestin grêle et deviennent la proie des microbes du gros intestin, en produisant des substances toxiques pour l'organisme. C'est le cas des diarrhées fétides observées par Albus dans ses chiens, comme nous avons montré dans notre travail sur la flore intestinale<sup>1)</sup>.

#### **Action des sucres sur la flore intestinale.**

Nous employons la glucose et la lactose, c'est à dire un sucre simple et un sucre interverti. Il est connu qu'on emploie ces substances dans la thérapeutique.

Nous avons fait ces expériences dans 3 buts principaux. L'un était de voir s'il était possible de transformer la flore du gros intestin en putréfaction par des sucres seulement et d'engendrer ainsi par leur produits un milieu peu convenable pour ces microbes de la putréfaction; l'autre était d'arrêter par l'œuvre même des sucres une putréfaction déjà commencée. Troisièmement nous avons voulu voir si la teneur en sucre de la dilution injectée, avait une influence quelconque sur certains microbes de la flore intestinale de homme adulte.

C'est ainsi que nous avons commencé l'étude par des doses faibles.

Nous injectons ainsi de la lactose à 1 % dans un morceau de gros intestin d'adulte.

La réaction reste neutre. Il y a une odeur butyrique, mélangée à une odeur très désagréable. La putréfaction ne subit aucun arrêt, au contraire elle semble plus prononcée que dans le témoin.

Lactose à 2 %. Après 24 heures la réaction est acide, on sent l'acide butyrique, il y a un grand développement de gaz, le morceau semble vouloir éclater.

Le microbe prédominant est le Bac. coli. Il y a encore des coccis et du Bac. perfringens. Ensuite l'acidité commence à diminuer et la putréfaction marche comme d'habitude.

---

1) Centralbl. f. Bakt., Abt. I, Orig., Bd. 62, 1912.



Lactose à 3 %. Après 24 heures réaction acide, mélange d'odeurs très curieuses, indéfinissables. La flore Gram-négative est prédominante. Il y a à côté de rares acido-tolérants, quelques coccis et de grandes quantités de *Bac. perfringens*. Ensuite la flore continue à être variée, l'odeur butyrique se fait toujours plus intense, mais pourtant il y reste encore un streptobacille acido-tolérant (*Streptobac. longus*) et le *Diplobac. irregularis*<sup>1)</sup> que dans le témoin est absent, mais en général la putréfaction reprend au bout de 17 jours sa marche comme dans le témoin.

Lactose à 5 %. Le même qu'auparavant.

Lactose à 8 %. Après 24 heures la réaction est très acide, l'odeur est d'acide butyrique bien marquée. Quoique les préparations montrent une prédominance de coccobacilles Gram-négatifs, pourtant l'ensemencement sur gélose ordinaire inclinée donne une culture abondante de streptocoque et quelques colonies de *Bac. coli*. On peut donc conclure que les microbes Gram-négatifs étaient des microbes pour la plupart morts<sup>2)</sup>.

Après 3 jours l'odeur d'acide butyrique diminue d'intensité. On sent une odeur fade, mais la réaction est acide encore. Les préparations montrent une culture presque pure de ce *Streptobac. longus* et de ce *Diplobac. irregularis*, mais après 9 jours la réaction devient neutre. Les préparations montrent encore beaucoup d'acido-tolérants, de coccis et des microbes ressemblant au type du *Rodella III* et de la putréfaction. Ensuite la putréfaction marche comme d'habitude.

Lactose à 10 %. Après 24 heures, odeur marquée d'acide butyrique, réaction extrêmement acide. Il semble sur les préparations n'y avoir qu'une culture pure d'acido-tolérants. Il y a pourtant des coccis et une grande quantité de microbes Gram-négatifs.

L'ensemencement sur gélose ordinaire inclinée donne des rares colonies de *Bac. coli*, tandis que le streptococcus est en grande quantité, on isole encore le *Bac. gazogenes parvus* (Choukiewitch).

Après 3 jours le *Bac. coli* a complètement disparu, la flore est uniquement Gram-positive.

Après 9 jours la réaction devient alcaline, les préparations montrent beaucoup de coccis, de l'entérocoque, quelques *Diplobac. irregularis*, du *Bac. perfringens* et quelques microbes de la putréfaction.

Ici se forme comme dans toutes les putréfactions de l'adulte une espèce d'huile qui empêche la marche de la putréfaction. On enlève l'huile, on lave avec de l'eau stérile, 24 heures après cette opération, le morceau sent très mauvais. En effet, le *Bac. putrificus coagulans* est en grande quantité avec ses spores caractéristiques.

Ces observations répétées plusieurs fois, nous montrent décidément que le lactose injecté directement dans le gros intestin de l'adulte jusqu'à la dose de 10 %, donne lieu à la formation de grande quantité d'acide butyrique et il n'est pas

1) Distaso, l. c.

2) Ce fait nous l'avons observé souvent dans nos essais.

capable à cette dose d'arrêter une putréfaction. Nous avons poussé les expériences plus loin, car celles-ci nous semblaient encore peu conclusives à ce sujet. Alors nous avons pris des doses beaucoup plus hautes.

Lactose à 15 et à 20 %. La même réaction qu'auparavant, odeur d'acide butyrique d'abord, ensuite il s'est produit une odeur de putréfaction avec les microbes caractéristiques qui la produisent.

D'autre côté dans un morceau de cœcum du même intestin, nous avons ajouté la même dose de sucres dans les mêmes conditions qu'auparavant, mais la réaction a été d'acide acétique tout de suite avec une flore homogène faite de microbes qui produisent cette substance et elle est restée telle après 3 mois en arrêtant la marche de la putréfaction.

Lactose à 30 %. Il se sont passés les mêmes phénomènes qu'avec les doses de 15 et 20 %.

Ces expériences nous indiquent clairement que l'arrêt d'une putréfaction ne dépend pas exclusivement de la quantité de sucres injectée, mais des microbes de la flore existants préalablement dans le morceau d'intestin. Comme on sait, la flore du cœcum contient habituellement le *Bac. bifidus* et les *bac. acétogènes*. Il est bien certain, comme nos observations le montrent, que ces microbes se sont développés, en arrêtant la putréfaction.

Glucose à 3 %. La réaction devient acide après 24 heures et sent fortement l'acide butyrique. La flore Gram-négative est prédominante, pourtant il y a quelques éléments d'acétogènes  $\beta$  et des coccis en abondance. L'ensemencement donne le *Bac. coli* comme microbes prédominants. Après 3 jours les choses sont à peu près pareilles. L'odeur est toujours butyrique.

Au bout de 9 jours, l'odeur d'acide butyrique est encore plus remarquable, aussi la réaction est encore acide. Également ici la formation de cette huile empêche la marche de la putréfaction.

Glucose à 5 %. Les choses sont à peu près pareilles que dans la précédente putréfaction.

Glucose à 8 %. Après 24 heures réaction acide, on sent une odeur d'acide acétique. La flore est composée exclusivement d'acétogènes. Les ensemencements sur la gélose couchée ordinaire donnent seulement une colonie de *Bac. coli*. Après 3 jours les choses sont les mêmes, sauf qu'il y a manque absolu de *Bac. coli* et la poussée de quelques éléments de *Bac. perfringens*.

Après 21 jours cette putréfaction ne montre pas une seule forme qui puisse se rapporter au *Bac. putrificus*. Mais il se forme ici, comme partout,

cette espèce d'huile que nous avons montrée comme la cause de l'arrêt de la marche de la putréfaction.

Glucose à 10 %. Après 24 heures la réaction est extrêmement acide. Les préparations montrent une culture pure d'acétogènes. Les cultures sont en ce moment négatives pour le *Bac. coli*, il est donc complètement détruit. Ainsi après 21 jours les processus sont pareils. Il n'y a pas encore de *Bac. putrificus*, et la flore n'est pas changée. L'huile qui se forme est enlevée, on lave le morceau et on le remet à l'étuve. Après 24 heures, la réaction devient alcaline, l'odeur butyrique se fait sentir, les microbes de la putréfaction sont évidents.

Les essais à la dose de 15, 20 et 30 % ont donné les mêmes résultats que ceux faits avec le lactose.

Des expériences que nous avons relatées plus haut, il résulte donc un renseignement très précis et très important, du point de vue des problèmes de la flore intestinale, c'est à dire qu'avec des doses très hautes de sucres il est possible d'empêcher une putréfaction à la seule condition que ces sucres trouvent les microbes capables de développer des substances empêchantes. En plus, il semble que le glucose a une action plus prompte que le lactose.

En effet, dans plusieurs bocaux où cette réaction s'est faite, les microbes acétogènes sont encore existants après 3 mois et ils ont donné à la pièce une odeur très agréable d'acide acétique, qui s'est conservée jusqu'à ce moment. Quand ces microbes sont absents ou en telle petite quantité qu'ils ne peuvent pas développer leur activité, ne peuvent pas, par conséquent, attaquer les sucres qui seront la proie exclusive des autres microbes, qui à leur tour ne permettront pas le développement des petites quantités des microbes empêchants. Cette hypothèse concorderait avec les résultats des expériences que nous avons maintes fois constatés et que nous avons relatés plus haut à savoir: une faible proportion de sucres faisait développer les microbes dont nous aurions voulu arrêter le développement. Ce fait inexplicable à première vue, éclaire selon nous, une des lois qui régissent la flore intestinale. Mais avant de passer à l'explication, il nous faut mentionner une expérience qui nous semble la clé de cette énigme, et que nous avons décrite dans notre travail sur les acétogènes<sup>1)</sup>. Nous avons, en effet, trouvé que lorsque le

1) Centralal. f. Bakt., I. Abt., Orig., Bd. 59, 1911.

Bac. bifidus ou un bac. acétogène quelconque est mis en symbiose avec le Bac. coli ou le Bac. perfringens, ces derniers se développent d'abord largement, puis le Bac. bifidus ou l'acétogène présent se développe d'une façon intense à son tour et finalement reste le vainqueur. Le Bac. coli et le Bac. perfringens après leur attaque violente sur les sucres, produisent par eux-mêmes une telle quantité d'acidité incompatible avec leur activité vitale. Au contraire, les acétogènes en général résistaient à une acidité très élevée et continuaient à attaquer les sucres qui restaient, en produisant des acides en plus, qui formaient ainsi un milieu que leur vitalité tolère très bien. Dans nos expériences sur l'intestin il s'est passé un phénomène semblable. En effet, nous avons établi que au fur et à mesure que la dose de sucres augmentait le Bac. coli et le Bac. perfringens disparaissaient plus vite. Quand les doses des sucres étaient minimales, ces bacilles dominaient le processus de putréfaction et ils restaient actifs, tandis que à hautes doses ils disparaissaient très vite. Ce fait nous permet d'expliquer aisément l'hypothèse que nous avons établie auparavant. En effet, une petite proportion de sucres attaquée par ces microbes ne permet pas de produire une haute proportion d'acide dangereuse pour leur existence et elle agissait comme un stimulant au contraire. D'autre côté, les acétogènes ne trouvent pas dans ces conditions la nourriture propre à leur développement, car les sucres étaient entièrement détruits. — De plus on doit pas perdre de vue que le Bac. coli et le Bac. proteus, quand ce dernier existe, sont les prédominants dans une flore intestinale d'homme adulte, ainsi ce sont eux qui sont destinés à se servir d'abord de la bonne nourriture que nous ajoutons, comme, par exemple, les sucres.

Nous insistons encore sur ce fait que nous avons constaté, que même dans les différentes parties du même gros intestin, les changements de la flore après l'inoculation des mêmes quantités de sucres, étaient différents et cela est dû à ce que, dans les différents segments du gros intestin la flore est quantitativement différente.

En outre, la putréfaction est arrêtée à la condition qu'ils existent des microbes producteurs de certains acides. Fait

important, ni le *Bac. coli*, ni le *Bac. perfringens* qui produisent des acides et prédominent dans la flore des morceaux d'intestin en putréfaction, quand on injecte des sucres en petites doses, sont capables d'empêcher une putréfaction dans l'intestin. Ces faits parlent contre l'hypothèse de Bienstock sur l'action empêchante du *Bac. coli*.

Nous étions ainsi conduit à étudier de plus près cette question, car nous avons observé que des doses très faibles de sucres, parfois 5 % a été capable d'arrêter la putréfaction dans l'intestin de l'enfant. L'intestin sentait agréablement l'acide acétique. Ainsi les échecs dans les essais sur l'intestin de l'adulte peuvent être dûs au fait qu'ici la flore du début est de beaucoup plus complexe et que beaucoup de microbes qui résistent à une acidité même très élevée, donnent des produits qui ne sont pas du tout capables d'empêcher la putréfaction. Exemple typique: ce *Diplobac. irregularis* très résistant aux acides, hôte constant de la flore intestinale, que nous avons décelée à la fin de chaque processus de putréfaction et qui donne des produits pas du tout empêchants pour les microbes de la putréfaction.

Nous avons alors conduit des expériences pour nous assurer quelle était la différence de réaction entre la flore de l'adulte et celle de l'enfant.

Nous avons répété les mêmes expériences d'auparavant sur l'intestin d'enfant mort de maladies qui n'ont rien affaire avec l'intestin et avec des intestins d'enfants morts de diarrhée verte. On ne pourrait pas nous faire ainsi l'objection d'avoir choisi pour nos expériences seulement des intestins, dont la flore intestinale était normale.

La conclusion en est que dans tous les cas, quand il s'agissait d'intestins d'enfants normaux, l'inoculation de solutions sucrés à 3, 4 ou 5 % était suivi par une réaction du côté des microbes acétogènes, qui formaient presque une culture pure.

Dans les intestins, dont la flore était très mauvaise, avec des solutions de sucres à 7 %, il a eu, dans 2 cas la réaction acétique, dans d'autres cas il y avait la réaction butyrique.

Il fallait s'assurer ensuite par quel mécanisme la putréfaction était arrêtée. Dès que nous avons trouvé dans nos

expériences relatées plus haut que les microbes du groupe des acétogènes sont ceux qui empêchent cette putréfaction et que nous savons d'autre côté que cette action est due aux produits que ces microbes forment en dedoublant les sucres, il nous est facile donc d'expérimenter sur ces produits isolés.

L'ensemble de ces faits nous conduisait à étudier d'abord l'action de certains acides sur la marche d'une putréfaction, ensuite la quantité nécessaire de ces acides pour empêcher une putréfaction.

Mais avant tout il est bien nécessaire de dire des expériences de Tissier et de Martelly<sup>1)</sup>. Ces auteurs trouvèrent que la dose minima pour empêcher la putréfaction de la viande de boucherie est de 10 %.

Nous nous sommes adressé principalement à l'acide acétique et l'acide lactique. Le premier on le sait est produit par les microbes de la flore intestinale appelés par nous acétogènes et qui forment la flore prédominante de l'enfant au sein maternel; le deuxième, on le sait, a des propriétés anti-putrides et il se trouve aussi dans les produits de métabolisme de ces microbes.

La première expérience était avec l'acide lactique à 1 % (8 cm). Après 24 heures la réaction était neutre. Aucune différence avec la flore du morceau de l'intestin témoin.

Acide lactique à 2 %. 20 cm. Odeur désagréable. Réaction alcaline comme le témoin. Microbes en petite quantité. Le *Bac. coli* est prédominant. Après 3 jours la réaction est encore alcaline, odeur très fade, mais non de putréfaction. Il y a des *bac. butyriques* et du *Bac. coli*. Après 9 jours la réaction devient alcaline, le morceau est fragile, le *Bac. putrificus* est en culture pure, il y a en outre du *staphylocoque*.

Ac. lactique à 4 %. 20 cm. Réaction acide, odeur mauvaise de putréfaction. Il y a beaucoup de *bac. coli*, une levure, des acétogènes en petites proportions et en mauvaises conditions.

Après 3 jours la réaction devient alcaline et il y a l'odeur de putréfaction. Les microbes existants sont le *bac. coli*, *streptocoque*, *bac. butyrique*, quelques rares acétogènes. Après 9 jours la putréfaction est horrible, le *Bac. putrificus* coagulant est en culture pure avec le *staphylocoque* liquefaciens.

Acide lactique à 6 %. 15 cm. Après 24 heures réaction très acide, il ne sent rien, tandis que le contrôle sent horriblement la putréfaction. Microbes rares; les acétogènes sont prédominants mais après 72 heures le morceau était complètement fragmenté.

1) Annales Institut Pasteur, 1902.

Acide lactique à 10 % et 8 %. 10 ccm. La réaction devient extrêmement acide, mais le morceau commence à se fragmenter. Après 72 heures il devient comme une bouillie. Les préparations montrent des formes en souffrance de *Bac. bifidus*.

Les intestins d'adulte ou d'enfant se sont comportés de la même manière vis-à-vis de cet acide.

Ces expériences nous montrent, que l'acide lactique jusqu'à 4 % ne peut pas empêcher une putréfaction, d'autre côté nous avons vu qu'à dose plus élevée il est capable de fragmenter la paroi intestinale du morceau que nous mettions à putréfier.

Bien autres sont les choses avec l'acide acétique.

Acide acétique 8 %. 15 ccm. Réaction acide. Après 18 heures, la flore est composée d'acétogènes et de coccis. L'ensemencement nous donne une seule colonie de *Bac. coli*; qui après 3 jours est complètement absent. La flore acétogène est alors complètement établie. Aussi après 24 heures que les tubes d'ensemencements sont restés à l'étuve, en faisant passer l'eau de condensation sur la couche de gélose et en remettant ces mêmes tubes à 37°, il n'y a pas une seule colonie de *bac. coli*.

Après 9 jours, réaction encore acide. Microbes en rares exemplaires.

Acide acétique 5 %. Le même que dans l'expérience précédente.

Acide acétique 4 %. 10 ccm. Après 24 heures réaction acide, le *Bac. coli* dans l'ensemencement existe seulement dans l'eau de condensation de la gélose inclinée avec beaucoup de coccis et quelques *bac. sporogènes*. Après trois jours la réaction est encore acide, il n'y a plus de *Bac. coli*, mais beaucoup d'acétogènes et il paraît y avoir des *bac. butyriques*.

Entre les produits de métabolisme de ces microbes il y a aussi l'acide formique et valérienique. Ces acides à la dose de 15 % n'ont eu aucune action empêchante.

Il résulte de ces expériences que l'acide acétique et lactique doivent être employés au moins à 6 % pour déterminer une action empêchante vis-à-vis de certaines microbes de la flore intestinale; mais il semble d'autre part que l'acide lactique est capable de fragmenter la paroi intestinale. De ce que nous venons de relater, il résulte avec toute évidence que ces acides dans certaines proportions sont capables d'arrêter une putréfaction et même d'exercer une action désinfectante, comme est le cas des acides acétique et lactique à 8 et à 10 %.

En comparant ces résultats avec ceux obtenus avec les sucres, il est clair, selon nous, comme nous avons déjà dit,

qu'il faut 3 conditions pour atteindre ce but: 1<sup>er</sup> existence des microbes producteurs de ces acides; 2<sup>me</sup> quantité de sucres assez élevées pour permettre aux microbes producteurs de ces acides de trouver la nourriture nécessaire et de l'emporter sur les autres et de s'installer définitivement pour jouer leur rôle empêchant; 3<sup>me</sup> il est nécessaire un certain degré d'acidité pour que la putréfaction soit arrêtée dans sa marche.

Nous avons vu dans les expériences précédentes que les acétogènes, microbes normaux de la flore intestinale et forts producteurs d'acide acétique, étaient capables d'empêcher une putréfaction. Il fallait nous assurer si un microbe producteur d'acide lactique et étrange à la flore intestinale est capable de s'acclimater dans l'ambiant intestinale et de deployer son action bienfaisante.

Nous avons choisi pour cette série d'expérience le bacille bulgare, qui n'existe jamais dans la flore normale de nos pays, qui est un fort producteur d'acide lactique et qu'on emploie dans le but thérapeutique. C'est ainsi que nous avons pris un cœcum d'un enfant mort de diarrhée infantile et nous avons injecté du glucose à 4 % et dans le même temps une pipette de culture pure de bac. bulgare en lactoserum. Après 48 heures la réaction est fortement acide, l'acétogène est en culture pure, éparpillé dans les préparations on trouve du bac. bulgare que nous isolons d'ailleurs. Il y a telle quantité d'acétogènes qu'ils poussent même, chose rare, sur la gélose ordinaire inclinée. Donc il est prouvé avec les résultats de cet ensemencement que le Bac. coli et le coccis sont anéantis par la poussée des acétogènes et du bac. bulgare en présence de quantité de sucres incapables par eux mêmes d'avoir cette action. Après 72 heures les préparations montrent beaucoup plus de bac. bulgare, il est donc bien vraisemblable qu'il s'est multiplié. Mais le morceau d'intestin se réduit à une bouillie et se désagrège. Dans cette bouillie, après six jours, il y avait une grande quantité de bac. bulgare encore, bien qu'il prenait la couleur par place seulement.

Il fallait naturellement répéter les expériences sur l'intestin de l'adulte après avoir constaté plusieurs fois les différences entre ce processus et celui qui se passe dans l'intestin de l'enfant.



Nous prenons ainsi un intestin d'adulte, nous le coupons en différentes parties et nous y ajoutons des sucres en solution à 10 % avec 2 c.c. d'une culture pure de bac. bulgare. D'abord le bac. bulgare se reproduisait très bien, comme s'il était le seul à pousser dans cet ambient. (On voyait seulement quelques rares entérocoques.) Ensuite toutes les autres formes de la flore intestinale disparaissaient et après 4 mois il est en culture pure et le milieu est encore extrêmement acide. Pourtant il semble mort, car nous n'avons pas pu le cultiver de ce milieu après ce temps-là.

De ces observations résulte: 1<sup>er</sup> qu'un microbe étranger à la flore intestinale peut s'acclimater dans le gros intestin de l'homme adulte, à condition, naturellement, qu'on lui donne sa nourriture; 2<sup>me</sup> qu'un microbe, comme c'est notre cas ici, producteur d'acide lactique, est capable dans ces conditions d'empêcher une putréfaction; 3<sup>me</sup> de détruire tous microbes qui se trouvaient déjà dans l'intestin.

Dans une deuxième série d'expériences faites de la même manière et avec un intestin d'enfant, où il y avait du Bac. proteus, ce dernier microbe existant encore après 24 heures, disparu ensuite. Lesensemencements étaient faits très largement. Le bac. bulgare s'était, aussi dans ce cas, installé et multiplié.

Cette observation est des plus intéressantes, car jamais avec des sucres seulement il nous a été possible d'anéantir le Bac. proteus.

Il nous reste encore à savoir si on peut arrêter une putréfaction quand elle est déjà arrivée à son maximum et par quel mécanisme elle s'arrête. Nous sommes partis dans ces essais, de l'idée de Liebig qui soutenait qu'une putréfaction, quand elle a commencé, ne s'arrête jamais. À ce propos nous avons fait plusieurs expériences. Nous en donnons ici quelques-unes: Un morceau d'intestin où le Bac. putrificus coagulans avait déjà fait son apparition est injecté avec 15 c.c. de lactose à 3 %. Après 24 heures les préparations montrent que l'entérocoque est devenu prédominant, la réaction devient faiblement acide. Mais la quantité du bac. putrificus n'a pas diminué du tout. (Ici le Bac. coli était déjà disparu.) Après 6 jours la réaction devient alcaline. La flore

est composée de *Bac. putrificus coagulans* et de *coccis* et sa marche est comme dans le témoin. Cette expérience montre que l'entérocoque n'est pas capable d'arrêter une putréfaction et que l'acidité seulement n'est pas la condition voulue pour produire ces effets, mais cette fonction appartenant à certains acides et à la quantité qui s'en produit.

La même expérience faite avec une appendice de chien donne des résultats semblables.

L'autre expérience que nous avons faite est la suivante. Après 2 jours de putréfaction dans un bout de cœcum on injecte d'abord 10 c. c. de lactose à 3 %. La réaction devient acide, les *coccis* deviennent les prédominants, les *Bac. putrificus* et le *Bac. perfringens* sont très rares; mais il y a beaucoup de spores. La production de gaz est énorme, on sent l'acide butyrique. Après 7 jours on injecte encore 10 c. c. de lactose à 10 %. L'odeur d'acide butyrique se fait plus intense. Les *coccis* sont presque les seuls microbes existant avec le *Bac. perfringens*.

Deux jours après cette dernière injection, la réaction devient alcaline et la putréfaction est plus horrible que dans le témoin. Nous avons observé la même chose avec un estomac de chien.

L'autre observation est la suivante:

Nous avons injecté dans un intestin de chimpanzé 2 fois, à 2 jours d'intervalle et ensuite 2 autres fois à 4 jours d'intervalle des solutions de lactose à 5 %, mais la putréfaction malgré cette quantité de lactose (40 c. c.) a marché comme chez le témoin.

Nous avons étendu à l'homme les expériences sur les animaux, quand nous avons pu nous procurer du matériel.

Aussi des morceaux ayant servi à d'autres expériences, au moment où le *Bac. putrificus* s'était développé dans toute sa vigueur, étaient injectés avec une solution de glucose à 20 %.

Après 24 heures, la réaction d'alcaline qu'elle était, devient acide, et le petit *Diplobac. irregularis*, le streptocoque se sont beaucoup développés. Après 8 jours on retrouve les mêmes choses mais l'odeur butyrique est plus intense. Ensuite la putréfaction marche comme d'habitude.

Digne de remarque est le cas suivant:

Nous étions déjà à la première phase de la putréfaction, quand nous injectons du glucose à 10 % en ayant enlevé préalablement l'huile dont nous avons parlé et lavé le morceau. La réaction devient neutre. Après 24 heures il y a une poussée de coccis, l'odeur n'est pas si mauvaise qu'auparavant. Après 48 heures l'odeur butyrique est très évidente, nous injectons encore du glucose à 15 %. Après 24 heures de cette injection le *Diplobac. irregularis* existe et la réaction est acide. 24 heures après cette dernière opération, on injecte en plus 6 c. c. de culture de bac. bulgare en lactosérum. L'odeur devient acide, il y a des coccis, du petit *Diplobac. irregularis* et du bulgare, mais il se présente souvent coloré par points, aussi après 3 jours de cette dernière injection on voit du bac. bulgare encore, la réaction est acide et le morceau est en bon état et semble frais.

L'autre expérience était la suivante: dans un morceau d'intestin dont la marche était arrivée à l'étape de la culture pure du *Bac. putrificus coagulans* nous injectons du glucose à 20 % et de 5 c. c. de bac. bulgare en lactosérum. La quantité d'acide produite était extraordinaire, la putréfaction s'est arrêtée à cause du grand développement du bac. bulgare et de l'acidité que ce microbe a produit. Nous avons encore dans le laboratoire un bocal contenant cette putréfaction arrêtée.

Nous croyons que ces expériences faites dans de très mauvaises conditions pour le bac. bulgare et avec un milieu où s'étaient accumulés les poisons des microbes de la putréfaction, il a été possible, grâce à la nourriture appropriée, de régénérer ce milieu putréfié.

Un microbe donc, pourvu qu'on lui donne la nourriture convenable, doit toujours pousser et dominer le tableau de la flore intestinale, grâce au milieu qu'on lui cré. Chose plus remarquable ces expériences montrent, avec toute évidence, que quand les microbes acétogènes sont disparus, il n'est plus possible par les coccis ou par les autres microbes de la flore intestinale d'arrêter une putréfaction dans l'intestin, quoique ils produisent des acides.

Ces expériences, comme celles relatives à l'influence des sucres, étaient répétées maintes fois, toujours avec les mêmes résultats.

De ces dernières expériences il se dégage, que les sucres sont capables, il est vrai, d'arrêter une putréfaction intestinale déjà commencée, mais cet arrêt n'est que temporaire. Ensuite avec la destruction des acides, la marche prend son chemin normal. Il y a donc des acides empêchants et des acides putréfiants.

En outre ces expériences nous donnent des renseignements très précieux sur la disparition de certains microbes et sur leur propriétés.

En effet, le *Bac. coli* après avoir produit les premières phases, disparaît en présence aussi de sucres. Au contraire, d'autres microbes y persistent comme c'est le cas de ceux appartenants au groupe du *Rodella III*, du groupe du *Bac. gazogenes parvus*, de l'entérocoque, du streptocoque, du staphylocoque, de certains acido-tolérants, qui sont réduits seulement à vie latente et ils peuvent jouer un rôle dès que le milieu leur devient favorable, mais leurs produits de métabolisme ne sont pas capables d'empêcher une putréfaction. Exemple typique: les cas où après l'injection des sucres le microbe prédominant devenait l'entérocoque et pourtant après un certain temps l'acidité était neutralisée et la putréfaction marchait de la même manière. En est ainsi des microbes producteurs d'acide butyrique.

Aussi le *bac. bulgare* est capable de s'installer en dépit des produits très toxiques de la putréfaction et il ne les craint pas.

En outre il semble qu'une petite quantité des sucres est comme un stimulant de la putréfaction.

#### **Action des purgatives sur la flore intestinale.**

Nous devons encore relater des expériences que nous avons faites en injectant dans l'intestin des purgatifs et des soi-disant désinfectants intestinaux, pour nous rendre compte des changements de la flore du gros intestin.

Il ne manquait pas d'expériences sur ce sujet. Il me suffit de citer les travaux de Strassburger (Zeitschr. f. klin. Med., T. 48, 1903) qui trouva que en ingérant la naphtaline en quantité telle qu'elle pouvait communiquer l'odeur aux selles, les microbes intestinaux augmentaient au lieu de diminuer.

Il trouva que le tannacol est parmi les soidisants désinfectants le seul capable de faire diminuer les microbes intestinaux.

D'un autre côté Cohendy<sup>1)</sup> trouva que le thymol ingéré à la dose de 9 à 12 g par jour, fait diminuer de 13 fois le nombre des microbes. Après ces expériences pourtant il restait encore à savoir qu'elles espèces microbiennes apparaissent à la suite de l'introduction de ces substances dans le tube digestif et qu'elle était la transformation de la flore intestinale par suite de leur présence, car on sait à l'heure actuelle que les purges salines agissent sur le gros intestin seulement.

Nous avons injecté 18 c. c. de solution saturée de sulphate de magnésie. Après 24 heures la réaction devient alcaline, la pièce est ballonnée. La flore Gram-négative est la prédominante, à côté on voit du Bac. perfringens et du bac. Rodella III. Dans cet intestin il y avait du Bac. proteus, qui ne disparaît pas.

La puanteur et l'alcalinité augmentent toujours. Après 6 jours il y a une énorme quantité de spores: signe évident de l'activité extraordinaire, dont il est siège le morceau. Ces résultats obtenus dans l'intestin d'un adulte sont les mêmes que ceux obtenus avec l'intestin d'un enfant.

Dans un autre intestin d'enfant mort de la diarrhée infantile, c'est en injectant le sulphate de magnésie que j'ai isolé le Bac. pyocyanique, tandis que dans le témoin cela était impossible.

Le calomel donne les mêmes réactions. Cette substance n'a aucune action détruisantes sur le Bac. proteus.

---

1) In Metschnikoff, Bull. de l'Institut Pasteur, 1902.

Nous sommes arrivés ainsi à étudier l'action des desinfectants intestinaux. Le choix est tombé sur le  $\beta$ -naphtol, salol et le tymol.

Nous injectons dans un morceau de gros intestin 10 c. c. d'une solution saturée de  $\beta$ -naphtol. Ce morceau et le moins puant, la réaction devient alcaline. La flore Gram-négative est très abondante, l'entérocoque se présente en belles chaînes. On voit aussi un microbe à baguette de tambour qui ressemble au *Rodella* III. Aussi cette substance n'a aucune action détruisante sur le *Bac. proteus*. Celui-ci se développe et poursuit son œuvre. Mais dans cette première expérience la substance injectée était en quantité très grande. Aussi nous avons répété l'expérience en injectant la quantité prescrite par la Pharmacopée officielle. La putréfaction était horrible et il semble de toute évidence que cette substance n'a aucune action empêchante sur la marche d'une putréfaction.

Même le salol n'a aucune action sur la putréfaction et donne les mêmes réactions sur la flore intestinale que le  $\beta$ -naphtol. Quant au thymol les expériences ont été faites en injectant une grande quantité de cette substance et les quantités prescrites par la Pharmacopée officielle.

Après 24 heures dans les deux cas la réaction était alcaline, le *Bac. proteus* subit une telle action d'arrêt qu'il se présente sur la gélose seulement après 48 heures, tandis que dans le témoin les tubes en étaient remplis. L'ensemencement après 3 et 6 jours donne une culture négative pour le *Bac. proteus*.

Il y a plus: Dans le cas d'un intestin d'enfant, même le *Bac. coli* n'était pas isolable sur la gélose ordinaire inclinée après l'introduction du thymol.

Si nous essayons de tirer des conclusions de ces expériences, nous pouvons bien affirmer que les purgatives ont une action très nette: ils font pousser les microbes putréfiants par le milieu alcalin qu'ils préparent.

Donc les purgatives et les desinfectants agissent en portant un déséquilibre dans la flore intestinale, mais surtout ils n'arrêtent

pas la putréfaction; au contraire par la réaction alcaline qu'ils donnent lieu ils font pousser des microbes comme le bac. pycyanique qui est toujours en petite quantité dans la flore intestinale.

Parmi les desinfectants intestinaux habituellement employés le thymol seul s'est trouvé capable d'une action détruisante vis-à-vis des microbes putréfaction. Il a été capable de diminuer l'activité du Bac. proteus dans tous les cas et de l'anéantir dans un seul cas. Les autres desinfectants employés n'ont eu aucune action d'arrêt sur les microbes de la putréfaction.

### Zusammenfassung.

Wir konnten zunächst die Tatsache feststellen, daß, wenn man in den Dickdarm gewisse Stoffe einführt, die ihm im normalen Zustande fremd sind, die Flora derart reagiert, daß die in dem Dickdarm sich befindenden Darmbakterien eine ganz besondere Kraft und Aktivität erlangen. Dieses Bild der Dickdarmflora finden wir in allen den Fällen wieder, in denen in den Dickdarm Stoffe gelangen, die von den Magensaften nicht angegriffen werden.

Wir haben auch festgestellt, daß die Zucker allein nicht immer die Darmfäule verhindern können. Sie besitzen diese Fähigkeit nur dann, wenn sich in dem Dickdarm gewisse Bakterien aus der Gruppe der Acetogenen<sup>1)</sup> befinden, die hemmende Substanzen zu erzeugen vermögen. Die Zuckermengen, welche diese Wirkung hervorrufen, schwanken je nach der Menge der Bakterien der genannten Gruppe. Den Beweis hierfür finden wir in der verschiedenen Reaktion der Dickdarmflora beim Kinde und bei Erwachsenen. Man kann nämlich mit 5 Proz., 8 Proz. oder 10 Proz. Zucker sehr leicht die Zersetzung in dem Darm des Kindes verhindern, während das beim Erwachsenen nicht immer selbst mit Dosen von 30 Proz. gelingt. Zur Erklärung dieser Tatsache sei darauf hingewiesen, daß die Darmflora des Kindes bekanntlich eine große Menge von acetogenen Bakterien enthält, während die

---

1) Distaso, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Orig., Bd. 59, 1911.

Darmflora des Erwachsenen fast frei davon ist. Diese hemmende Wirkung wird durch die Säuren hervorgerufen, welche die genannten Bakterien entwickeln und welche ein für das Wachstum der anderen Bakterien der Darmflora sehr ungünstiges Milieu schaffen. Wir haben den Säuregrad festgestellt, welchen die genannten Bakterien erzeugen müssen, um eine hemmende Wirkung hervorzurufen. Die Versuche, welche wir mit Essig- und mit Milchsäure gemacht haben, die die einzigen hemmenden Säuren und die hauptsächlichsten Produkte dieser hemmenden Bakterien sind, führten zu dem Resultat, daß der erforderliche Säuregrad mindestens 6 Proz. betragen muß. Da sich in dem Dickdarm keine Milchsäurebakterien finden, wie wir dies in früheren Arbeiten festgestellt haben<sup>1)</sup>, so mußte zunächst konstatiert werden, ob ein Milchsäurebakterium wie der *Bacillus bulgaricus* erstens sich in den Fäulnisprodukten anzusiedeln und seine hemmende Tätigkeit zu entfalten vermag, zweitens ob er, der der Darmflora fremd ist, allein unter gleichzeitiger Vernichtung der anderen Bakterien zu wachsen vermag. Unsere Resultate beweisen, daß diese Bakterien sich ansiedeln können, vorausgesetzt, daß man ihnen ein für ihre Entwicklung günstiges Milieu gibt und daß sie, wie das auch zu erwarten war, die Fäulnisprozesse verhindern können. Ja noch mehr, sie vermögen sogar eine Fäule in jedem Stadium anzuhalten. Dann haben wir noch festgestellt, daß es fäulnisverhindernde Säuren gibt und Säuren, die von Fäulnisbakterien ergriffen und umgewandelt werden. Wir kennen zwei Säuren, die die Fäule zu verhindern vermögen: die Essigsäure und die Milchsäure.

Endlich haben wir versucht, uns Rechenschaft zu geben über die Tätigkeit der Purgantien und der sogenannten Darmdesinfizienten. Aus unseren Versuchen geht hervor, daß diese therapeutischen Mittel, anstatt den Fäulnisprozeß zu verhindern, ihn vielmehr befördern, denn sie geben dem Darminhalt eine äußerst starke alkalische Reaktion, die den Fäulnisbakterien günstig ist. Das Thymol scheint jedoch eine gewisse Hemmungseigenschaft zu besitzen, wenigstens im Beginn.

---

1) Distaso, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Orig., Bd. 59, 1911.



Ueber die Vorgänge der Darmfäulnis außerhalb des Organismus haben wir Untersuchungen angestellt, über die wir im einzelnen demnächst berichten wollen. Es war mir unmöglich, bei meiner ersten Arbeit, da wo ich von den Fäulnisbakterienarten spreche, eine genaue Definition derselben zu geben, denn es erschien notwendig, weitere Anhaltspunkte zu erhalten, um sie näher zu bestimmen. Ich stütze mich also bei Bestimmung genannter Arten auf drei Hauptpunkte:

- 1) ihre Produkte in vitro, in Kulturmilieus und in Reinkultur;
- 2) ihre Gegenwart in gewissen Phasen der Fäule und
- 3) ihre Fähigkeit, Säuren bei Gegenwart von Zucker zu bilden, jedoch vermögen diese Produkte die Fäule nicht zu verhindern.

Außerdem kommen, abgesehen von den Acetogenen, alle anderen Bakterien der Dickdarmflora während der Fäule der Darmkanalwand vor und gedeihen innerhalb derselben. Man findet sogar solche, welche wie die Streptokokken mit den stärksten Fäulnisbakterien gedeihen. Wir haben im Verlaufe dieser Arbeit gesehen, daß alle diese Bakterien selbst, wenn man enorme Dosen von Zucker in den in Fäulnis befindlichen Teil des Darmes injiziert, nur zeitweilig eine Säurereaktion hervorriefen, die trotzdem die Fäule nicht verhindern konnte, denn der Fäulnisprozeß wurde wohl einige Tage aufgehalten, um dann wieder seinen gewöhnlichen Verlauf zu nehmen. Unsere Versuche gestatten uns also, alle diese Bakterien als Fäulnisbakterien (putréfiants) zu betrachten, die jedoch nicht unbedingt eine Fäule herbeiführen müssen. Wir lassen hierbei ihre diastatische Wirkung ganz außer acht. Sogar die Colibakterien müssen als Fäulnisbakterien betrachtet werden, obgleich Autoren, wie Bienstock, Tissier, ihnen eine gewisse hemmende Wirkung zuschreiben wollen, wobei sie sich auf Versuche in vitro stützen. Wir haben in unserer ersten Arbeit gezeigt, daß, obgleich diese Bakterien in der ersten Fäulnisperiode vorherrschend sind, sie nach derselben verschwinden. Im diesem Teile haben wir gesehen, daß dieselben selbst bei Vorhandensein großer Zuckermengen keine hemmende Wirkung hervorrufen. Sie besitzen sonach in der

Darmflora nicht die Eigenschaften, welche man ihnen zugeschrieben hat. Was uns betrifft, so betrachten wir alle Bakterien der Darmflora mit Ausschluß der Gruppe der Acetogenen als Fäulnisbakterien, d. h.:

- 1) als Mikroorganismen, welche in Reinkultur in zuckerfreiem Milieu übelriechende Produkte darstellen;
- 2) welche sich stets in dem Fäulnisprozeß finden;
- 3) welche selbst in Kontakt mit Zucker die Fäule nicht zu verhindern vermögen.

Die experimentelle Basis, auf welche sich diese Auffassung stützt, findet sich ausführlich in den Versuchen dargestellt, über welche wir bereits berichtet haben. Darnach besteht die Darmflora aus 2 großen Bakteriengruppen, den fäulnisverhindernden und den eigentlichen Fäulnisbakterien. Die ersteren stellen die vorherrschenden Bakterien der Darmflora des Kindes, die letzteren die beim Erwachsenen prädominierenden Bakterien dar.

Nach diesen Schlußfolgerungen müssen wir den Begriff der Fäule noch erweitern und versuchen, eine umfassendere Definition derselben zu geben als in unserer ersten Arbeit. Wir müssen ferner annehmen, daß die Albuminderivate bis zum Pepton und selbst vielleicht bis zu gewissen Aminosäuren in Fäulnis untergehen, d. h. daß sie in einfache Produkte überführt werden. Mit anderen Worten: es bestehen Gradunterschiede in der Fähigkeit der Bakterien, das reine oder veränderte Albuminmolekül anzugreifen, aber nach Beendigung der Prozesse werden die Resultate in beiden Fällen sein, die betreffenden Substanzen bis in die einfachsten Produkte abzubauen.

*Nachdruck verboten.*

[Aus dem Hygienischen Institute der Königl. Tierärztl. Hochschule zu Berlin (Direktor: Geh. Medizinalrat Prof. Dr. Frosch).]

## **Die photobiologische Sensibilisierungstheorie in der Pellagrafrage.**

Von **Otto Umnus.**

(Eingegangen bei der Redaktion am 6. März 1912.)

In dem rastlosen Streben nach einer endgültigen Erklärung für die Entstehungsursache der Pellagra sind zahllose Theorien aufgestellt worden.

Der Uebersicht wegen teilen wir die bedeutendsten Pellagralogen nach ihren Theorien am besten in folgende Gruppen ein:

- 1) Die Zeïsten.
- 2) Die Toxikozeïsten.
- 3) Die Vertreter der bakteriellen Aetiologie.
- 4) Die Vertreter der autotoxischen Aetiologie.
- 5) Die Vertreter der toxischen Aetiologie.
  - a) Die Vertreter der einfach-toxischen Aetiologie.
  - b) Die Vertreter der sensibilisierend-toxischen Aetiologie.

Die Zeïsten (Hauptvertreter: L u s s a n a) führten die Entstehung der Pellagra auf alimentäre Insuffizienz des Maises zurück, d. h. auf die Armut des Maises an stickstoffhaltigen Substanzen. Diese Annahme und andere ähnliche, nach der z. B. die Maisnahrung wegen schwerer Verdaulichkeit vom Körper nicht oder nur wenig ausgenutzt werden könnte, wurden experimentell widerlegt. Der gesunde Mais ist ein nährstoffreiches und sehr gut verdauliches Nahrungsmittel.

Die Toxikozeïsten (Lombroso, Gosio, Di Pietro, Ceni etc.) erklärten auf Grund ihrer mannigfachen Versuche und klinischen Erfahrungen nur den unreifen oder verdorbenen Mais bzw. dessen Zersetzungsprodukte oder die auf solchem

Mais vegetierenden Hyphomyceten für gesundheitsschädlich. Gesunder Mais wäre unschädlich.

Die Vertreter der bakteriellen Aetiologie (Majocchi, Cuboni) hielten gewisse, von ihnen mit besonderen Namen belegten Schizomyceten für die wahren Pellagraerreger. Die Bakterien erwiesen sich später als Kartoffelbacillen (Paltauf und Heider).

Die Anhänger der autotoxischen Hypothese (v. Neusser, De Giaksa) nahmen eine gastro-intestinale Intoxikation als Ursache an, ohne für ihre Behauptungen sichere experimentelle Belege erbringen zu können.

Alle Forscher stellten sich, von der völlig widerlegten Theorie der Zeïsten abgesehen, auf den Standpunkt, gesunder Mais wäre unschädlich und nur verdorbener pellagrogen. Ganz besonders scharf schieden die Toxikozeïsten zwischen gesundem und verdorbenem Mais und ließen den gesunden außerhalb ihrer sehr umfangreichen Studien. Gesunder und unschädlicher Mais waren für sie identische Begriffe.

Erst in unserem Jahrhundert brach sich die Erkenntnis immer mehr Bahn, daß jede Maissorte, ob gesund oder verdorben, toxische Substanzen enthalte, daß die Pellagra auf exogener Intoxikation beruhe (Sturli, Langstein, Bezola, Luksch, Ballner).

Die Forschung nach dem im Mais präformierten Toxin, die mit großem Eifer betrieben wurde, erhielt durch eine hochbedeutsame Publikation v. Tappeiners eine ganz neue Richtung. v. Tappeiner hatte eine eigenartige Wirkung fluoreszierender Farbstoffe entdeckt, die er Photodynamie nannte. Mit dieser Bezeichnung wird im wesentlichen derselbe Begriff, wie mit „photobiologischer Sensibilisation“, gekennzeichnet und zum Ausdruck gebracht, daß fluoreszierende Farbstoffe im Licht schädlich wirken, im Dunkeln nicht. Die Photodynamie beruht auf einer Art Sensibilisation, ist aber keineswegs mit der photographischen Sensibilisation identisch. Um Mißverständnissen vorzubeugen, nennen wir diese neuartige Wirkung photobiologische Sensibilisation.

Die Entdeckung v. Tappeiners wurde von 4 Forschern (Hausmann, Lode, Horbaczewski, Raubitschek) gleichzeitig und unabhängig voneinander auf die Pellagra zur Erklärung ihrer Aetiologie übertragen.

Nach Hausmann soll die Pellagra durch ein Toxin verursacht werden, das der Sensibilisator (der gelbe Maisfarbstoff) im Körper bildet. Der Sensibilisator wirke also nur mittelbar durch Produktion eines Toxins. Das Gift selbst werde vom Organismus gebildet, und der Farbstoff rege ihn zu dieser Bildung an. In dieser anregenden Wirkung liege die Sensibilisation.

Lode hält nur gelben Mais infolge seines Gehaltes an gelbem Maisfarbstoff für schädlich, den weißen Mais für unschädlich.

Nach Horbaczewskis Ansicht wäre die Pellagra eine Intoxikationskrankheit, die außer vom Maisfarbstoff vielleicht noch durch ein Toxin verursacht würde.

Zu einem ähnlichen Resultat gelangte Raubitschek. Die im Mais vorhandenen Toxine wären alkohollösliche photodynamische (d. h. also nur im Licht wirksame) Stoffe.

Zur Nachprüfung der von Raubitschek und Horbaczewski erzielten Resultate wurden in Anlehnung an ihre Versuchsanordnungen nachfolgende Experimente angestellt.

### Vorbemerkungen.

Weißes und graues Mehl wurden teils mit gelbem Maismehl bester Qualität, teils mit feinstem weißem Maismehl oder entkeimtem Mehl gefüttert<sup>1)</sup>.

Außerdem wurde ein unzweifelhaft pellagrogenes Mehl aus der Gegend von Mailand zu Kontrollversuchen verwendet.

Alle gefütterten Maissorten und -produkte sind nach König leicht verdaulich und enthalten sämtliche Nährstoffe

---

1) Alle Einzelheiten sind aus den Tabellen ersichtlich.

in genügender Menge und in kaum nennenswertem Unterschiede zum Roggen und Weizen, wie sich aus folgenden Tabellen ergibt <sup>1)</sup>).

Mehlerzeugnisse	Wasser %	Stickstoff- haltige Substanzen o/o	Fett %	Stickstofffreie Substanz %	Roh- faser %	Asche %
Weizenkorn	13,37	14,00	1,98	80,03	1,90	2,09
Feinstes Mehl	12,53	11,93	0,91	86,66	Spur	0,50
Grobes Mehl	11,59	17,12	3,14	76,83	0,88	2,03
Roggenkorn	11,74	12,18	1,94	82,12	1,66	2,10
Weißmehl	13,04	9,18	1,14	88,47	0,41	0,80
Schwarzmehl	12,32	17,12	2,65	76,75	1,37	2,11
Kleie	10,90	17,94	3,72	68,56	4,80	4,98
Ganzer Mais	13,32	9,86	4,56	68,58	2,18	1,51
Maismehl	12,99	9,62	3,14	71,70	1,41	1,14
Maisgrieß	11,03	8,84	1,05	78,04	0,36	0,68
Teile des Mais- kornes:						
Schalen	14,50	5,77	1,41	60,20	16,85	1,27
Keim	15,50	16,34	25,03	32,83	2,75	7,55
Kern	12,50	8,20	1,35	76,61	0,65	0,68

Auffällig ist der hohe Fettgehalt des gelben Maises und bemerkenswert, daß im Maiskeime fast das ganze Fett des Maiskornes enthalten ist. Schale und Kern bestehen zu etwa 1 Proz. aus Fett, der Keim zu über 25 Proz.

Diese einzige Abweichung von der chemischen Zusammensetzung der übrigen Cerealien könnte Anlaß geben, die Ursache der Maisvergiftung in seinem hohen Gehalt an einem vielleicht giftigen Oel zu suchen.

Um diese Annahme zu widerlegen, wurde der entkeimte und damit zum größten Teile entfettete Mais gefüttert (Tabelle XIII). Bei allen Versuchen ist der Mais in Form der Polenta verabreicht worden.

Die Polenta wurde aus Maisgrieß und Wasser in folgender Weise hergestellt: Zu einem Liter kochenden, gesalzenen Wassers werden 250 g gelbes Mehl genommen, welches ins Wasser getan und ca. 15 Minuten lang mit einem Holz-

1) König, Untersuchungen menschlicher Nahrungs- und Genußmittel.

löffel gerührt wird. Das Verhältnis zwischen Wasser und Mehl muß auch bei größeren Quantitäten stets innegehalten werden <sup>1)</sup>).

Eine bestimmte und von allen Forschern streng vorschriftsgemäß auszuführende Herstellungsweise der Polenta scheint uns sehr geboten, weil bei willkürlichen Zubereitungsarten von vornherein Bedenken gegen die Beweiskraft der Versuche des einen oder anderen entstehen könnten.

Die große Quellungsfähigkeit des Maisgrieß gestattet die Herstellung einer sehr wasserreichen Polenta. Der unverhältnismäßig hohe Wassergehalt würde die Polenta zu einem unzureichenden Nahrungsmittel machen. Nicht alle Autoren haben genauere Angaben über die Zubereitung der Polenta gemacht. Raubitschek erwähnt nur, er habe die Polenta mit physiologischer Kochsalzlösung zubereitet.

Um bezüglich des Salzgehaltes eine feste Norm innezuhalten, haben wir Wasser mit einem Zusatz von etwa 1 Proz. Salz verwendet und beobachtet, daß die Tiere so gesalzene Polenta sehr gern fraßen. Die wasserreiche Nahrung ersetzte zugleich das Trinkwasser, das den Tieren in kleinen Glaschälchen nur vorgesetzt zu werden brauchte, wenn sie wenig oder gar nicht fraßen. Die Polenta wurde im Uebermaße gefüttert, täglich etwa 10 g pro Maus. Die Futterreste wurden am anderen Tage entfernt und durch stets frisch bereitete Polenta ersetzt.

Als Käfige dienten offene Glaszylinder, die oft gereinigt wurden, damit die Tiere stets reine Luft und ein trockenes Lager hatten. Ganz besonders begünstigt waren die Versuche von einem fast andauernd guten Wetter. Die Sonne schien fast jeden Tag und schon von 11 Uhr ab so intensiv, daß die Tiere in den Schatten gesetzt werden mußten. Sie wurden dem Sonnenlicht nur bis 11 und nachmittags von  $1\frac{1}{2}$  Uhr ab ausgesetzt. Die einzelnen Versuche sind in nachfolgenden Tabellen zusammengestellt. Jede Tabelle enthält eine in sich abgeschlossene Versuchsgruppe.

---

1) Nach einem Rezept der großen Mailänder Handelsfirma Unione Cooperativa.

## Tabellen.

## I.

Weiße Mäuse. Polenta aus gelbem Maisgrieß. Licht. Glaskäfig.

I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
No. des Tieres	Beginn des Versuches	Anfangsgewicht in g	Tod des Tieres am	Gewicht des toten Tieres in g	Lebensdauer in Tag.	Erstes Auftreten von Symptomen am	Die wichtigsten Symptome	Sektionsbefund	Bemerkungen
1.	6. VII.	20	7. VIII.	13	32	20. VII.	Spärl. Haarausfall am Kopf u. Rücken. Hyperämie der Ohren. Lichtscheu. Erythem am Kopf. Apathie. Herabsetzung der Reflexerregbarkeit. Parese der hint. Extremität. Tonisch-klonische Krämpfe. Kachexie.	Rötung der Dünndarmschleimhaut und Schwellung der Leber, Milz, Nieren. Blase gefüllt.	
2.	6. VII.	21	8. VIII.	13	33	24. VII.	dgl.	dgl.	
3.	"	22	23. VII.	14	17	22. VII.	Apathie und Lähmungserscheinungen	negativ	
4.	"	19	20. VII.	10	14	20. VII.	dgl.	"	
5.	"	20	18. VII.	15	15	13. VII.	Schwäche, Appetitmangel.	"	
6.	10. VIII.	25	15. IX.	18	36	22. VIII.	Wie No. 1.	Enteritis haemorrhagica. Stark gefüllte Mesenterialvenen. Schwellung der Leber und Milz.	
7.	"	25	17. IX.	17	38	24. VIII.	Wie No. 1 u. Parese der vorderen Extremitäten.	Hyperämie des ganz. Darmes. Schwellung der blutgefüllten Nieren.	
8.	"	25	10. IX.	16	31	22. VIII.	Haarausf. am Kopf, Nacken u. Rücken. Parese der Nachhand. Letale Krämpfe. Erythem am Kopfe.	Hyperäm. u. Schwellung der Dünndarmschleimhaut. Blutfülle in den Mesenterialvenen.	
9.	"	25	10. IX.	20	31	28. VIII.	Wie No. 8.	Wie No. 8 und Schwell. der Leber und Milz. Blase gefüllt.	
10.	"	25	1. IX.	19	21	30. VIII.	Hyperämie der Ohren. Apathie. Parese der Nachhand. Krämpfe.	Kopf, Hals u. Brust angefressen. Darm-schleimhaut hyperämisch.	



II.

Weiße Mäuse. Polenta aus gelbem Maisgrieß. Licht. Glaskäfig mit Abblendung.

I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
1.	15.VIII.	24	14. IX.	20	30	3. IX.	Sehr geringer Haar- ausfall am Kopf u. Rücken. Schwäche. Apathie. Hyper- ämie der Kopfhaut und Ohrmuscheln. Parese der hinter- en Extremitäten. Krämpfe.	Hyperämie der Baucheingeweide. Blutfülle in den Mesenterialvenen. Schwellung der Milz um das Drei- fache. Blase prall gefüllt.	
2.	15.VIII.	20	16. IX.	18	32	3. IX.	dgl.	dgl.	
3.	"	20	26.VIII.	15	11	24.VIII.	Lähmung der Ex- tremitäten. Hin- fälligkeit.	"	
4.	"	21	24. IX.	15	40	12. IX.	Wie No. 1	Wie No. 1	
5.	"	22	16. IX.	16	32	8. IX.	Wie No. 3.	negativ	

III.

Weiße Mäuse. Polenta aus gelbem Maisgrieß, der 3 Wochen dem Sonnen-  
licht ausgesetzt war. Licht. Glaskäfig.

I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
1.	30.VIII.	17	30. IX.	10	31	6. IX.	Geringer Haarausf. und Hyperämie am Kopf. Hyperämie der Ohren. Hin- fälligkeit. Kachexie. Parese der Extre- mitäten. Krämpfe.	Vermehrte Flüssig- keitsansammlung im Thorax. Rötung und Schwellung der Dünndarmschleim- haut. Schwellung der Leber, Milz und Nieren. Blase ge- füllt.	
2.	30.VIII.	15	14. IX.	10	15	12. IX.	Lähmungserschei- nungen. Appetit- mangel. Hinfällig- keit.	negativ	
3.	"	16	14. IX.	12	15	13. IX.	dgl.	"	
4.	"	20	18. IX.	14	19	17. IX.	Geringer Haaraus- fall etc., wie No. 1.	Wie No. 1	
5.	"	25	1. X.	18	32	7. IX.	Wie No. 1.	Wie No. 1 und starke Rötung der Glome- ruli in den gelblich verfärbten Nieren.	

IV.

Weiße Mäuse, Polenta aus gelbem Maisgrieß, vorbehandelt mit Sodalösung.  
Licht. Glaskäfig.

Versuch nach 7 Tagen abgebrochen. Nach 3-tägiger guter Fütterung  
wurden die Tiere zu dem Versuch No. V verwendet.

## V.

Weiße Mäuse. Licht. Glaskäfig. Polenta aus gelbem Maisgrieß, vorbe-  
handelt mit Salmiakgeist.

I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
1.	26.VIII.	25	23. IX.	18	28	3. IX.	Appetitmangel, all- gemeine Schwäche	Duodenitis haemor- rhagica	Der Versuch
2.	"	24	19. IX.	18	24	2. IX.	dgl.	Schwellung der Milz. Blase gefüllt	wurde am 1. Oktober ab- gebrochen
3.	"	25	—	—	—	—	symptomlos		
4.	"	25	—	—	—	—	"		

## VI.

a) Weiße Mäuse. Licht. Glaskäfig. Polenta aus gelbem Maisgrieß. Oelfarbe.

b) " " Dunkel " " " " " "

c) " " Licht " Gemischte Kost. Oelfarbe.

d) " " Dunkel " " " "

No.	Beginn am	Gewicht in g	Tod am	Gewicht des toten Tieres	Lebensdauer	Beginn des Haar- ausfalles	Stärke des Haarausfalles	Ausdehnung des Haarausfalles	Be- merkungen
a)									
1.	25.VIII.	20	23. IX.	14	29	4. IX.	Sehr starker Haar- ausfall u. Erytheme	Kopf fast kahl. Nak- ken und Rücken ganz kahl	Der Versuch wurde am 25. X. abge- schlossen
2.	"	15	18. IX.	11	24	3. IX.	dgl.	dgl.	
3.	"	16	20. IX.	12	26	3. IX.	"	"	
b)									
1.	25.VIII.	14	—	—	—	8. IX.	Geringer Haaraus- fall	Spärlicher Haarver- lust am Kopf und Rücken	
2.	"	15	—	—	—	10. IX.	dgl.		
3.	"	14	—	—	—	15. IX.	"		
c)									
1.	25.VIII.	16	—	—	—	4. IX.	Geringer Haaraus- fall	dgl., aber nicht am Kopf	
2.	"	18	—	—	—	4. IX.	dgl.		
3.	"	16	—	—	—	6. IX.	"		
d)									
1.	25.VIII.	19	—	—	—	—	Sehr geringer Haar- ausfall	Kaum nachweisba- rer Ausfall am Rück- ken. Gleicht sich während des Ver- suches wieder aus	
2.	"	16	—	—	—	—	dgl.		
3.	"	15	—	—	—	—	"		

Die photobiologische Sensibilisierungstheorie in der Pellagrafrage. 469

VII.

Weiße Mäuse. Licht. Glaskäfig. Polenta aus gelbem Maisgrieß. Nach 14 Tagen im Dunkeln.

Licht					Dunkel							
No.	Beginn am	Gewicht in g	Tod am	Gewicht des toten Tieres	Ueber- gesetzt am	Zu der Zeit in g	Vorhandene Symptome	Hinzu- tretende Symptome	Tod am	Gewicht des toten Tieres	Sektion	Be- merkungen
1.	10.VIII.	20	20.VIII.	14	—	—	Apathie. Appe- titmangel	—	—	—	negativ	Die Tiere No. 4—10 leb. u. haben d. Ge- wichtsverl. z. T. wied. aus- geglichen. Sie s. voll. munt. u. symptom- fr. Ihr Haar- kleid ist glatt u. glänz. weiß
2.	„	22	—	—	20.VIII.	17	Erytheme. Schwäche	Pares.d.Extr., Krämpfe	4. IX.	14	Duoden. hae- morrhagica	
3.	„	20	—	—	„	14	dgl.	dgl.	7. IX.	12	dgl.	
4.	„	20	—	—	„	16	Erytheme. Schwäche. Haarausfall	—	—	—	—	
5.	„	19	—	—	„	14	dgl.	—	—	—	—	
6.	„	18	—	—	„	15	„	—	—	—	—	
7.	„	20	—	—	„	17	„	—	—	—	—	
8.	„	21	—	—	„	17	Hyperämie der Ohrmuscheln	—	—	—	—	
9.	„	17	—	—	„	14	Erytheme. Schwäche	—	—	—	—	
10.	„	18	—	—	„	15	dgl.	—	—	—	—	

VIII.

Weiße Mäuse. Licht. Glaskäfig. Polenta aus gelbem Maisgrieß. Nach 14 Tagen gemischte Kost. Im Licht.

Licht					Licht							
1.	10.VIII.	15	13.VIII.	12	—	—	Appetitmangel, Schwäche	—	—	—	negativ	
2.	„	17	24.VIII.	11	—	—	dgl.	—	—	—	Blutstauung in Mesen- terialvenen	
3.	„	20	—	—	24.VIII.	17	Appetitmangel, Erytheme	Später Haar- ausf.,Parese, Krämpfe	2.IX.	13	Schwellung der Milz	
4.	„	19	—	—	„	16	dgl.	dgl.	3.IX.	11	Duoden. hae- morrhagica	
5.	„	19	—	—	„	16	„	—	—	—	—	
6.	„	18	—	—	„	13	„	—	—	—	—	

IX.

Weiße Mäuse. Licht. Glaskäfig. Polenta aus gelbem Maisgrieß. Nach 14 Tagen gemischte Kost. Im Dunkeln.

Licht					Dunkel							
1.	10.VIII.	19	—	—	24.VIII.	14	Appetitmangel. Schwäche. Hy- peräm. d. Ohren	—	—	—	—	Die Tiere leb. u. sind munter. Der Ge- wichtsverlust ist völlig aus- geglichen
2.	"	24	—	—	"	20	dgl.	—	—	—	—	
3.	"	20	—	—	"	14	"	—	—	—	—	
4.	"	22	—	—	"	16	"	—	—	—	—	
5.	"	17	—	—	"	12	"	—	—	—	—	

## X.

Weiße Mäuse. Dunkel. Glaskäfig. Polenta aus gelbem Maisgrieß.

5 Tiere im Gewicht von 19—24 g. Beginn 10. VIII. Kein Todesfall.

Gewichtsabnahme nur bei 1 Tiere um 3 g (von 18,0 auf 15,0).

## XI.

Weiße Mäuse. Licht. Glaskäfig. Polenta aus gelbem italienischen Maismehle.

I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
No. d. Tieres	Beginn des Versuches	Anfangsgewicht in g	Tod des Tieres am	Gew. d. toten Tieres in g	Lebensdauer in Tagen	Erstes Auftreten von Symptomen	Die wichtigsten Symptome	Sektionsbefund	Bemerkungen
1.	1. X.	22	—	—	—	—	3 g Gewichtsverlust	—	
2.	"	20	—	—	—	—	—	—	
3.	"	20	—	—	—	—	—	—	
4.	"	19	—	—	—	—	2 g Gewichtsverlust	—	

## XII.

Weiße Mäuse. Dunkel. Glaskäfig. Polenta aus gelbem italienischen Maismehl

I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
1.	1. X.	18	—	—	—	—	—	—	
2.	"	19	—	—	—	—	—	—	
3.	"	22	—	—	—	—	—	—	
4.	"	25	—	—	—	—	—	—	

## XIII.

Weiße Mäuse. Licht. Glaskäfig. Polenta aus gelbem entkeimten Maismehl

I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
1.	16. IX.	10	26. IX.	6	10	23. IX.	Lähmungsartige Schwäche. Letale Krämpfe	Gelblich verfärbte Nieren. Schwellung des Parenchyms	Die Tiere starben relativ schnell, vielleicht wegen ihr. groß. Jugend. Nach Horbaczewski h. d. Alter a. d. Lebensdauer einen Einfluß, und zwar leben ältere Tiere länger.
2.	"	9	29. IX.	5	13	20. IX.	Spärl. Haarausfall. Apathie	negativ	
3.	"	11	4. X.	6	18	"	Spärl. Haarausfall. Apathie. Parese d. Extremitäten. Hinfälligkeit	Blutfülle der Mesenterialdrüsen. Hyperämie des Dünndarms mit hämorrhagischen Punkt.	

## XIV.

Weiße Mäuse. Licht. Glaskäfig. Polenta aus feinstem weißen Maismehl.

I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
1.	10. VII.	20	26. VIII.	12	16	22. VIII.	Bei allen Tieren sehr starker Haarausfall am Kopf, Nacken, Rücken. Außerdem: Kachexie <sup>1)</sup> , Schwäche, Parese der hinteren Extremitäten. Krämpfe.	Duodenitis haemorrhagica, Schwellung der Parenchyme	1) Bei allen Tieren.
2.	„	22	4. IX.	12	25	20. VIII.	dgl.	negativ	
3.	„	22	10. IX.	14	31	„	Appetitmangel, Parese der Extremität.	wie No. 1	
4.	„	24	9. IX.	14	29	„	dgl.	dgl.	
5.	„	16	30. VIII.	10	20	„	„	Wie No. 1 und sehr ausgesprochene wäßrige Beschaffenheit, welche Muskeln	No. 5 war trächtig: Obduktion ergab 6 fast ausgewachsene Föten

## XV.

Weiße Mäuse. Dunkel. Glaskäfig. Polenta aus feinstem weißen Maismehl.

I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
1.	10. VIII.	20	—	—	—	—	—	—	Am 30. IX. abgebrochen.
2.	„	19	—	—	—	—	—	—	Tiere gesund und munter.
3.	„	20	—	—	—	—	—	—	Gewichtsverlust 1—3 g.
4.	„	16	1. X.	16	20	—	Schwäche, Appetitmangel	Pneumopleuritis	
5.	„	18	—	—	—	—	—	—	

## XVI.

Weiße Mäuse. Licht. Glaskäfig. Gemischte Kost.

5 Tiere im Gewicht von 12 bis 18 g. Beginn am 6. VII. Die Tiere gingen am 4. VIII. infolge starker Mittagssonne während einer halben Stunde ein.

4 Tiere im Gewicht von 11 bis 18 g. Beginn am 5. VIII. Tiere sind munter, haben etwas an Gewicht zugenommen.

## XVII.

(4) Weiße Mäuse im Gewicht von 12—21 g. Beginn am 6. VII. Dunkel.

Futter: gemischte Kost.

Käfig: Glaszylinder.

Am 27. IX. eine Maus war tot. Sektionsbefund: hellgelber Fibrinbelag auf Lungen und Brustpleura, trübes und reichliches Exsudat im Thorax. Lunge stark gerötet. Pleura matt und rauh. In der Leber Finnen.

## XVIII.

(4) Graue Mäuse im Gewicht von 10—19 g. Beginn am 10. VIII. Licht.

Futter: Polenta aus gelbem Maisgrieß.

Käfig: Glaszylinder.

Die Tiere sind frei von Symptomen. Gewichtsverlust bei einer Maus 3 g.

## XIX.

Weiße Mäuse. Licht. Glaskäfig. Ohne Nahrung.

No.	Beginn am		Tod am		Lebensdauer	Anfangsgewicht in g	Gewicht des tot. Tieres in g	Gewichtsdifferenz in g	Symptome	Sektion	Bemerkungen
	Tag	Std.	Tag	Std.							
Licht.											
1.	13. IX.	9 <sup>a</sup> a.m.	15. IX.	2 <sup>a</sup> p.m.	2 Tg. 5 Std.	16	11	5	Starke Abmagerung. Hinfälligkeit, Kollaps <sup>1)</sup>	Leerer Verdauungstraktus, sonst negat. dgl.	1) Keine Lähmungen oder Krämpfe
2.	„	dgl.	„	3 <sup>a</sup> p.m.	2 Tg. 6 Std.	16	11	5	dgl.	dgl.	
Dunkel.											
1.	13. IV.	9 <sup>a</sup> a.m.	17. IX.	8 <sup>a</sup> p.m.	4 Tg. 6 Std.	16	9,5	6,5	Starke Abmagerung. Hinfälligkeit, Kollaps <sup>1)</sup>	Leerer Verdauungstraktus, sonst negat. dgl.	1) Keine Lähmungen oder Krämpfe
2.	„	dgl.	„	10 <sup>a</sup> p.m.	4 Tg. 8 Std.	16	10	6	dgl.	dgl.	

## XX.

Weißer Mäuse. Mittagssonne. Polenta aus gelbem Maisgrieß bzw. gemischte Kost.

No. des Tieres	Gewicht in g	Art des Käfigs und der Abblendung	Art der 10-tägigen Fütterung	Beginn, Stunde	Durchschnitts-temperatur	Als wichtigste Symptome traten auf nach Minuten						Bemerkungen
						I.	II.	III.	IV.	V.	Im Durchschnitt	
						Unruhe	Exzitation	Depression	Krämpfe	Tod		
1 2 3	16 12 20	Glaskäfig ohne Abblendung	Polenta aus gelbem Maisgrieß	11 <sup>b</sup> a.m.	35°	12	36	65	71 72 71	72 72 73	72	1) Lichtstrahlen ganz abgeblendet
1 2 3	12 17 16	Glaskäfig mit grauem Pauspapier umwickelt	dgl. „ „	dgl.	34°	14	42	70	75 77 77	76 78 79	78	
1 2 3	18 17 16	Glaskäfig mit schwarzem <sup>1)</sup> Pauspapier umwickelt	dgl. „ „	„	37°	30	85	135	141 143 146	144 144 148	145	
1 2 3	19 19 18	Drahtkäfig „ „	dgl. „ „	„	34°	14	42	70	76 76 78	77 77 79	78	
1 2 3	16 16 18	Glaskäfig ohne Abblendung	Gemischte Kost	11 <sup>b</sup> a.m.	35°	12	38	68	72 72 73	73 74 74	74	
1 2 3	19 18 16	Glaskäfig mit grauem Pauspapier umwickelt	dgl. „ „	dgl.	34°	14	40	73	73 77 78	75 79 79	79	
1 2 3	12 14 16	Glaskäfig mit schwarzem Pauspapier umwickelt	dgl. „ „	„	37°	30	85	135	144 144 145	145 145 147	145	
1 2 3	16 18 19	Drahtkäfig „ „	dgl. „ „	„	34°	14	40	73	77 79 78	78 80 79	79	

## Bemerkungen zu den Tabellen.

No. I. Die Polenta-Mäuse fraßen anfangs nur wenig, gewöhnten sich aber schließlich an das fremdartige Futter. Sie gingen im Nährzustande zurück, zeigten beträchtliche Gewichtsverluste. Ihr Haarkleid verlor an Glanz und Glätte. Die Haare gingen stellenweise aus. An den unbehaarten Kopfteilen traten geringgradige Erytheme auf, mehr oder weniger diffuse Rötungen, die sich durch Fingerdruck beseitigen ließen. Die Ohrmuscheln waren hyperämisch. Die Atmung unregelmäßig und beschleunigt, etwa 80 Atemzüge in der Minute. Die Augen wurden nicht geöffnet. Es bestand Lichtscheu und leichte Verklebung der Lider (Conjunctivitis).

Allmählich wurden die Tiere apathisch, gegen Berührung fast ganz unempfindlich. Die Reflexerregbarkeit war herabgesetzt. Es kam zu Mattigkeit, Schwäche und Parese der hinteren Extremitäten, seltener der vorderen. Die Tiere schleiften beim Gehen die Beine nach oder konnten sich kaum noch aufrecht halten. Dann berührte der Leib den Boden und mit den Beinen wurden hilflose Schwimmbewegungen ausgeführt.

Nach 1–2 Tagen folgten der paralytischen Depression heftige Krampferscheinungen als Vorboten des herannahenden Todes. Im Krampf richteten sich die Tiere oft plötzlich in die Höhe, nahmen in dieser Stellung mit ihren starr vom Körper gestreckten Beinen eigentümliche Haltungen an, fielen um oder überschlugen sich rücklings, blieben kurze Zeit in krankhaften Zuckungen liegen und verendeten.

Die Sektion ergab keinen charakteristischen Befund. Der Magen war meist leer, der Dünndarm gewöhnlich mit einer schleimig-zähen gelben Masse gefüllt, der Dickdarm mit wenigen gelb bis rotbraunen Skybala. Die Darmschleimhaut etwas geschwollen, hin und wieder mit punktförmigen Hämorrhagien besetzt. Die Darmgefäße und Mesenterialvenen mit Blut stark gefüllt. Leber und Milz bisweilen nicht unerheblich vergrößert, ebenso die oft gelblich verfärbten Nieren. Die Harnblase meist stark gefüllt (Lähmung des Detrusor vesicae?).

Die Brustorgane waren gesund.

In 2 Fällen wurden scheinbare Abszesse von Erbsengröße in der Leber gefunden. Bei näherer Untersuchung erwiesen sie sich als Abkapselungen eines 4 bzw. 5 cm langen Wurmes mit Saugnäpfen, Hakenkranz und Endblase. Es waren ausgewachsene Formen von *Cysticercus fasciolaris*.

Blutausstriche und Blutaussaaten auf Gelatine und Agar waren keimfrei.

No. II. Die Glaszylinder wurden mit grauweißem Pauspapier umhüllt. Im übrigen war die Versuchsanordnung die gleiche wie in No. I.

Die Ablenkung des Lichtes schützte die Tiere nicht vor ihrem Schicksal. Der Tod trat unter den gleichen Symptomen und in fast derselben Zeit ein wie bei I.

No. III. In der Annahme, eine 3-wöchentliche Sonnenbestrahlung könnte den schädlichen Stoff im Mais vernichten oder in seiner Wirkung steigern, wurden weiße Mäuse mit derart vorbereitetem Mais gefüttert.

Die Tiere zeigten die gleichen Symptome und gingen nach der gleichen Zeit ein, als hätten sie unbelichteten Mais erhalten.

Es trat also weder Steigerung, noch Abschwächung oder Aufhebung der toxischen Wirkung ein.

No. IV und V. Die in Norddeutschland bekannte Entgiftung der Lupinensamen mit Sodalösung oder Salmiakgeist veranlaßte uns, besonders weil das Verfahren wegen seiner Einfachheit allgemein praktische Bedeutung hat, auch den Mais durch Behandlung mit Soda oder Salmiak unschädlich zu machen.



Der Landwirt behandelt seine Lupinen vor der Fütterung in folgender Weise: Er läßt sie 48 Stunden in einer 1-proz. Sodalösung mit Erneuerung der Flüssigkeit liegen und laugt mit Wasser aus oder er versetzt sie mit der 3-fachen Menge Wasser, fügt pro Zentner 5 kg Salmiakgeist hinzu und laugt sie nach 2—3 Tagen gründlich mit Wasser 7—10 Tage lang aus. Der Maisgriß kann nicht tage- und wochenlang in Sodalösung oder verdünntem Salmiakgeist liegen. Er wird ungenießbar. Wir ließen ihn etwa 8 Stunden in einer 1-proz. Sodalösung und reinigten ihn dann so lange mit Wasser, bis die Flüssigkeit ganz klar wurde. Der hohe Fettgehalt des Mais führte aber zur Seifenbildung, die sich durch unangenehm seifigen Geruch bemerkbar machte.

Die Mäuse fraßen die Polenta fast gar nicht. Der Versuch mußte daher abgebrochen werden. Darauf wurde das zweite Verfahren angewendet. Wir brachten 100 g Mais in eine Mischung von 10 g Salmiakgeist in 300 g Wasser<sup>1)</sup> und ließen sie darin 8 Stunden liegen.

Nach dem Salmiakbade wurde der Mais gründlich gewaschen, bis das abfließende Wasser geruch- und farblos war. Der etwa noch im Maisgriß vorhandene Salmiakgeist verflüchtigte vollkommen bei der Bereitung der Polenta auf dem Feuer. Mit der aus diesem Maisgriß hergestellten Polenta wurden 4 weiße Mäuse gefüttert, von denen 2 verendeten und 2 bis zum Abschluß des Versuches am Leben blieben. Die typischen Symptome, wie in No. I, konnten nicht beobachtet werden. Der Versuch bedarf wegen seines nicht eindeutigen Ausfalles einer Nachprüfung.

No. VI. Um einen stärkeren Haarausfall zu erzielen, bestrichen wir die Mäuse mit einer durch Zufall hierfür geeignet gefundenen Farbe. Sie bestand, soweit ermittelt werden konnte, aus Majolikalack und einer mit Mohnöl bereiteten roten bzw. violetten (rot + kobaltblau) Oelfarbe. Mit dieser Farbe bestrichene weiße Mäuse erhielten teils gelbe Polenta, teils gemischte Kost, und zwar die einen im Licht, die anderen im Dunkeln. Die belichteten Polentamäuse wurden nach wenigen Tagen längs des rot oder violett gefärbten Rückens völlig kahl. Die übrigen Tiere zeigten nur Spuren von Haarausfall. Die Einzelheiten des Versuches ergeben sich aus der Tabelle.

No. VII—IX. Aus den Tabellen No. VII—IX ist deutlich zu sehen, daß die Dunkelheit die Tiere vor dem Tode schützt, auch wenn sie ausschließliche Maisnahrung erhalten.

Änderten wir die Kost, und gaben statt Mais ein durchaus gesundes, gemischtes Futter, ließen die Tiere aber im Licht stehen, so gingen sie fast alle an der tödlichen Nachwirkung der Polentafütterung unter dem Einfluß des Sonnenlichtes zugrunde. Uebertrugen wir die Polentamäuse aus dem Licht ins Dunkle und gaben ihnen gemischte Kost, dann blieben alle Tiere am Leben.

---

1) Das Verhältnis von Mais : Wasser : Salmiakgeist = 1 : 3 : 0,1 wurde stets innegehalten.

No. X. Mit gelber Polenta wurden 4 weiße Mäuse im Dunkeln gefüttert, und zwar vom 20. August bis zum Abschluß der Arbeit.

Alle Tiere sind munter und symptomlos, nur eine Maus zeigt eine unwesentliche Gewichtsabnahme von 3 g.

No. XI. Vom 1. Oktober ab erhielten 4 weiße Mäuse im Dunkeln gelbes italienisches Maismehl billiger Qualität in Form von Polenta. Trotz der unzweifelhaft toxischen Wirkung dieses aus einem Pellagrabezirke stammenden Maisproduktes blieben alle Tiere gesund.

No. XII. Das gleiche Futter erhielten ebenfalls vom 1. Oktober ab 4 weitere Mäuse im Lichte. Auch diese Tiere blieben munter und verendeten nicht.

Im Dunkeln konnte demnach Mais verschiedener Wirkung ohne Nachteil für die Tiere gefüttert werden. Auch hatte der sicher toxische italienische Mais vom 1. Oktober ab weder im Licht, noch im Dunkeln einen schädigenden Einfluß auf die Tiere.

No. XIII. Der letzte Versuch mit gelbem Mais sollte den Nachweis erbringen, daß die Schädlichkeit des Maises nicht auf seinem ungewöhnlich hohen Fettgehalte beruhe.

Man hatte experimentell nachgewiesen, daß entölter Mais unschädlich wäre. Die Extraktion des Fettes erfolgte aber in allen Fällen mit Alkohol. Man extrahierte also zugleich mit dem Fett alle alkohollöslichen Stoffe und Toxine. Der entölte Mais war durch die Extraktion entgiftet.

Ein Extraktionsmittel durfte also nicht verwendet werden und deshalb benutzten wir entkeimten Mais<sup>1)</sup>. Da fast das gesamte Maisfett im Keim enthalten ist, wird der Mais durch die Entkeimung auf ein den anderen Cerealien äquivalentes Nährstoffverhältnis gebracht. Aber der Mais verlor durch die Entkeimung seine schädigende Wirkung nicht.

Das Maisfett an und für sich scheint demnach keinen Einfluß auf die deletäre Kraft des Mais zu haben. Der fettreiche Mais ist ebenso schädlich, wie der fettarme.

No. XIV und XV. Die Polenta war aus feinstem weißen Maismehl hergestellt. Die belichteten Tiere zeigten, abgesehen von den Erythemen, alle Symptome, die bei der Fütterung von gelbem Mais beobachtet wurden. Der Haarausfall war um vieles stärker: der Rücken der Tiere wurde völlig kahl. Der Versuch ist von besonderer Wichtigkeit, weil er uns vor Augen führt, daß die schädliche Wirkung des Mais nicht auf seinem Gehalt an Farbstoff ausschließlich beruhen kann.

Der farblose Mais ruft alle in No. I beschriebenen Symptome mit Ausnahme des Erythems hervor. Will man also den Farbstoff in kausalen Zusammenhang zur Maiskrankheit bringen, so kann er nur als Ursache des Erythems in Betracht kommen.

No. XVI und XVII. In Kontrollversuchen wurden je 5 Mäuse im Licht bzw. im Dunkeln mit gemischter Kost gefüttert. Die Versuche begannen am 6. Juli. Die belichteten Tiere gingen am 4. August infolge

1) Hergestellt von einer sächsischen Dampfmühle und Oelfabrik.

starker Sonnenbestrahlung ein. Es mußten also 5 neue Tiere eingestellt werden. Bis zum Abschluß der Arbeit waren alle Tiere gesund und frei von jedem Symptom.

No. XVIII. Kontrollversuch. 4 graue Mäuse wurden mit gelber Polenta vom 10. August ab im Licht gefüttert. Die Tiere erkrankten nicht.

No. XIX. Die Tabelle zeigt, daß hungernde Tiere im Dunkeln mehr als doppelt so lange leben wie im Licht. Die gesteigerte Lebenstätigkeit im Licht dürfte den frühen Tod unter dem Einfluß der Sonne zur Folge haben.

No. XX. Den Einfluß des Sonnenlichtes auf weiße Mäuse, die 10 Tage lang gelbe Polenta bzw. gemischte Kost erhalten hatten, versuchten wir durch die Versuche der letzten Tabelle festzustellen. Die Tiere wurden in Gitter- oder Glaskäfigen teils mit, teils ohne Abblendung der Mittagssonne bei etwa 35° C ausgesetzt. Die Art des Käfigs hatte auf die Mortalität der Tiere kaum einen Einfluß: sie starben im Gitterkäfig fast ebenso schnell, wie im Glasbehälter.

Auffällig war die relativ lange Lebensdauer im schwarzen Glasbehälter trotz der um 1–3° höheren Temperatur.

Je weniger die Tiere den Sonnenstrahlen ausgesetzt waren, um so länger lebten sie. Das Krankheitsbild war folgendes:

Nach 10–14 Minuten langer Belichtung werden die Tiere unruhig, laufen im Käfig hin und her, setzen sich auf die Hinterbeine, recken sich hoch. Der Atem beschleunigt sich mehr und mehr und ist zuletzt fliegend. Es kommt zu Schweißausbruch, der am Kopf beginnt und sich allmählich über den ganzen Körper erstreckt. Hyperämie der Haut, Erytheme am Kopf, das feine Adergeflecht der Ohren tritt deutlich blutrot hervor, längs des Schwanzes verlaufen 4 rote Streifen. Hyperämie der Extremitäten. Die Tiere werden sehr erregt und springen andauernd in die Höhe. Allmählich lassen die Kräfte nach. Es beginnt das Stadium der Depression. Die Tiere werden apathisch, bewegen sich nur langsam vorwärts und fallen um, wenn sie sich an die Wand gelehnt aufzurichten versuchen. Die Reflexe sind herabgesetzt, geringe Empfindlichkeit bei Berührung. Lichtscheu, die Augen werden nicht geöffnet, tonischer Krampf und Tod.

Einige Tiere wurden im Stadium der Depression aus dem Licht ins Dunkle gesetzt. Sie starben trotzdem nach  $\frac{1}{2}$ –1 Stunde.

### Schlußbemerkung.

Die Experimente bestätigen die von Horbaczewski und Raubitschek erzielten Versuchsergebnisse. Gelbe Polenta war nur im Licht schädlich. Im Dunkeln konnte sie ohne Nachteil für die Tiere gefüttert werden. Zeigten die Tiere bereits Symptome und wurden sie vom Licht ins Dunkle übertragen, so verschwanden die Erscheinungen, die Mäuse blieben gesund.

Änderten wir nach einiger Zeit die Kost und gaben statt Polenta eine gemischte Nahrung (Semmeln, Hafer, Milchreis, Käse), so gingen die Tiere mit zwei Ausnahmen an der deletären Nachwirkung der Maisfütterung ein.

Eine neue Tatsache brachte der Versuch mit weißem Maismehl. Alle mit weißer Polenta gefütterten Tiere gingen unter den bereits beschriebenen typischen Symptomen ebenso schnell zugrunde, als wenn sie gelbe Polenta erhalten hätten. Den auffälligen Resultaten mußten wir in unseren Schlußfolgerungen Rechnung tragen und kamen deshalb zu einer anderen Auffassung über die Aetiologie der Maiskrankheit, als Horbaczewski und Raubitschek.

In Uebereinstimmung mit ihnen nehmen wir zwar auch an, daß die Pellagra eine sensibilisierende Intoxikationskrankheit sei, bei deren Entstehung ein fluoreszierender Farbstoff einen gewissen Anteil hat, aber wir legen den Ton auf die Intoxikation und halten den gelben Maisfarbstoff im wesentlichen nur für die Ursache des Hauterythems.

Wenn die Resultate der Maisfütterung, wie es hier geschieht, auf die Pellagra übertragen werden, so müssen wir uns darüber Klarheit verschaffen, ob die an Tieren beobachteten Symptome zur Diagnose Pellagra ausreichen. Im Grunde dürfte die toxische Maiswirkung auf Tiere erst dann als pellagrogen angesehen werden, wenn alle bei der Pellagra beobachteten klinischen Symptome und pathologisch-anatomischen Veränderungen auch im Experiment zur Beobachtung gelangen.

Obwohl diese Bedingung bisher nicht erfüllt werden konnte, trugen sämtliche Autoren keine Bedenken, ihre Versuchsergebnisse auf die Pellagra zur Erklärung ihrer Aetiologie in Anwendung zu bringen.

War die Beweisführung auch nicht völlig geglückt, so sprach doch eine Reihe von Vergleichspunkten mit höchster Wahrscheinlichkeit für die Identität der Pellagrasymptome mit den bei Maisfütterung auftretenden Erscheinungen.

Beide Symptomkomplexe werden durch Mais erzeugt, bei beiden spielt die Disposition eine große Rolle, und bei beiden sind die gleichen Systeme, die Haut, der Verdauungstraktus, das Nervensystem erkrankt.

Wenn die Tiere die Krankheitserscheinungen nicht in so ausgebildetem Grade wie chronisch-pellagröse Patienten zeigten, so lag es offenbar nur an ihrer kurzen Lebensdauer. Das Krankheitsbild konnte sich nicht so schnell zu seiner schrecklichen Vollendung entfalten.

Die Diagnose auf Pellagra scheint auch differentialdiagnostisch sichergestellt zu sein. Bei chronischer Inanition oder unzureichender Ernährung beobachtet man nicht einmal einen „in solcher Regelmäßigkeit und in solcher Ausdehnung“ (Ballner) auftretenden Haar- ausfall, geschweige denn die anderen typischen Symptome. Es ist keine Krankheit bekannt, bei der die gleichen Erscheinungen unter ähnlichen Bedingungen (Belichtung) beobachtet worden wären.

Da wir also bis heute keinen Grund zum berechtigten Zweifel an der Identität der Pellagra des Menschen und der Maiskrankheit der Tiere haben, dürfen die für diese eruierten Ursachen auch auf die Pellagraätiologie bezogen werden. Wie bereits ausgeführt, waren alle Theorien über die Aetiologie der Pellagra experimentell widerlegt worden oder dürften vorläufig als widerlegt angesehen werden. Nur die Theorie der exogenen Intoxikation konnte aufrecht erhalten werden. Sie gewann also schon per exclusionem an Bedeutung, verlor aber andererseits wieder an Wahrscheinlichkeit durch drei Tatsachen, die der Annahme eines Maistoxins scheinbar entgegenstanden und in Frageform so lauten würden:

- 1) Warum erkrankten nicht alle Tiere an der Maiskrankheit?
- 2) Warum erkrankten die Versuchstiere nicht im Dunkeln?
- 3) Warum beobachtet man keinen Krankheitsfall in kühleren Jahreszeiten, besonders in den Wintermonaten?

Dem ersten Einwande ist leicht zu begegnen.

Man muß mit der Tatsache rechnen, daß die Pellagra und viele andere Krankheiten gleichsam Auslese unter den unglücklichen Wesen halten, die sie heimsuchen wollen.

Die Syphilis ist nicht auf Kühe, Pferde oder Schweine übertragbar, der Malleus nicht auf Rinder und die Rinderpest nicht auf Menschen. Sogar unter Tieren der gleichen Species werden die einen von einer bestimmten Krankheit befallen,

die anderen nicht. Wir erinnern, was besonders im Hinblick auf die verschiedenen Ergebnisse der Fütterungsversuche mit weißen und grauen Mäusen interessant sein dürfte, an die Melanose. Sie befällt und tötet nur weiße Pferde<sup>1)</sup>.

Viele Hypothesen suchen diese auffälligen Tatsachen, die unzweifelhaft für ein selektives Verhalten der Krankheiten sprechen, zu erklären. Hier sei nur auf Horbaczewski hingewiesen, der bezüglich der Pellagra die Vermutung ausspricht, daß bei den immunen Tieren gewisse Fermente oder Antitoxine, bzw. Präzipitine oder auch andere Einrichtungen vorhanden sind, durch welche die Wirkungsweise des Farbstoffes (nach Horbaczewski das spezifische Maistoxin) beeinflußt wird.

Horbaczewski verweist auf das von v. Neusser hervorgehobene Verhalten des Amygdalin, welches „bei Katzen ungiftig, bei Kaninchen und Hunden dagegen giftig wirkend ist“.

Auch Apomorphin hätte er erwähnen können, das von Katzen in einer zehnfach größeren Dosis ohne Schaden vertragen wird als von mittelgroßen Hunden und bei diesen als Emetikum wirkt, bei Schweinen auch in der größten Dosis nicht.

Das verschiedene Verhalten der toxischen Substanz bietet also nichts Auffallendes und weist, wie Horbaczewski richtig bemerkt, anderweitige Analogien in großer Zahl auf.

Die Beantwortung der zweiten und dritten Frage bot vor der Entdeckung v. Tappeiners und Raabs, überhaupt vor der experimentellen Erkenntnis des bedeutungsvollen Einflusses der Sonnenstrahlen auf den tierischen Organismus, unüberwindliche Schwierigkeiten.

Darin liegt auch der Grund für das späte Ansehen, dessen sich die exogene Intoxikationstheorie erst seit wenigen Jahren erfreuen durfte.

Der negative Ausfall der Fütterungsversuche im Dunkeln beweist noch nicht, daß es bei Lichtabschluß überhaupt zu keiner toxischen Wirkung käme. Befällt doch die Pellagra

---

1) Cf. die Mortalitätsziffern der Pferde des Danziger Husaren-Regimentes.

auch Individuen, die sich in jeder Hinsicht vor dem Sonnenlicht geschützt hatten.

Die Wirkung des Maistoxins ist ohne Sonnenlicht nur äußerst schwach und verlangsamt.

Es ist wahrscheinlich und durch weitere Versuche nachzuprüfen, daß die Versuchstiere, entsprechend lange gefüttert, auch in der Dunkelheit erkranken.

Die Sonne steigert nur die toxische Wirkung, und zwar bis zur höchsten Potenz ihrer Schädlichkeit. Die im Sonnenlicht erhöhte Reaktionsfähigkeit, der beschleunigte Blutkreislauf, die größere Lebenstätigkeit aller Organe befördern die pellagrogene Wirkung des Toxins. Den großen Einfluß der Lichtstrahlen zeigen die Versuche No. XIX und XX.

Verlieren die heißen Sonnenstrahlen ihre Intensität, wie in kühlen Monaten, oder kommen sie überhaupt nicht zur Geltung, wie im Dunkeln, dann werden offenbar die Organe gegen die Toxinwirkung widerstandsfähiger und die Erscheinungen treten zurück.

Die genannten Tatsachen bzw. Erwägungen sprechen also durchaus nicht gegen die Annahme eines Toxins. —

Außer dem Toxin ist noch ein anderer schädlicher Stoff im gelben Mais enthalten — der fluoreszierende Farbstoff.

Seine Wirkung scheint aber doch von untergeordneter Bedeutung zu sein. Bei Fütterung von farblosem Maismehl treten die gleichen Erscheinungen auf, wie bei Verabreichung gelber Polenta. Nur ein Symptom, das Hauterythem, konnte nicht beobachtet werden, wenn weiße (farblose) Polenta gefüttert wurde. Das Auftreten des Erythems scheint also an die Gegenwart des gelben Farbstoffes gebunden zu sein. Alle übrigen Symptome können nicht durch den Farbstoff allein hervorgerufen werden. Diese Tatsache findet in einem Versuche Horbaczewskis eine gute experimentelle Begründung. Horbaczewski applizierte seinen Versuchstieren (Mäusen, Kaninchen, Meerschweinchen, Hunden) reinen Maisfarbstoff subkutan oder per os oder durch Einreibung in die Haut.

Die subkutane Injektion ergab nur eine lokale Hautentzündung. Die Einreibung von Maisfarbstoff in die Haut hatte überhaupt kaum noch einen nachweisbaren Erfolg, die

Einführung per os ebenfalls keine nennenswerten Erscheinungen zur Folge. Die überhaupt beobachteten Symptome traten nach so langer Fütterung auf, daß der Autor zeitweise im Begriff stand, den Versuch als „ganz aussichtslos“ abubrechen.

Dieser fast ergebnislose Versuch mit dem Farbstoff und die vorerwähnten positiven Resultate bei Fütterung von weißem, also farblosem Mais, sind zwingende Beweise für das Vorhandensein eines Toxins.

Gegen die Existenz eines Maistoxins spricht auch nicht die experimentell erwiesene Tatsache, daß mit Alkohol extrahierter und dadurch entfärbter Mais unschädlich und das gewonnene farbstoffhaltige Oel schädlich ist.

Durch die Extraktion mit Alkohol ist nämlich das alkohol-lösliche Maistoxin aus dem Mais in das Oel übergeführt worden. Es hat also den gleichen Weg wie der Farbstoff zurückgelegt. Da aber nur dieser sichtbar war, hielt man ihn ausschließlich für die Ursache der Krankheit<sup>1)</sup>.

Wir dürfen auch nicht unberücksichtigt lassen, daß fast alle pflanzlichen Nahrungsmittel fluoreszierende Farbstoffe enthalten. Wie weit verbreitet ist z. B. das fluoreszierende Chlorophyll und in wie großen Mengen wird es alljährlich von Menschen und Tieren mit der Nahrung aufgenommen.

Die photodynamische Wirkung des Chlorophylls ist experimentell durch W. Hausmann erwiesen.

Nicht jede photodynamische Wirkung ist schädlich.

Nach Hausmann ist es wahrscheinlich, daß die photodynamische Wirkung des Chlorophylls mit den synthetischen Assimilationsprozessen — also mit physiologischen Funktionen — der grünen Pflanzen im engsten Zusammenhange steht. Gesetzt aber, die photodynamische Wirkung des fluoreszierenden Maisfarbstoffes wäre eine pathologische, so könnte sie sich immer nur auf die Körperteile erstrecken, die dem Licht zugänglich sind, also nur auf die Haut, und sie könnten nur dann zur Geltung kommen, wenn der Farbstoff in der

---

1) Diesen Irrtum beging auch cand. med. vet. W. Oehmke (Centralblatt f. Physiol., 1909, No. 22) bei der Untersuchung des Buchweizens auf photodynamische Effekte.



Haut abgelagert wird und mit den Körperzellen in direkte Berührung kommt. Für die Abscheidung von Farbstoff in die Haut ist bisher noch kein Beweis erbracht.

Sieht man von dieser wichtigen Voraussetzung (der Ablagerung in die Haut) ab, so können bei allen mit Hautaffektionen verbundenen Krankheiten, die auf ein fluoreszenzfarbstoffhaltiges Nahrungsmittel zurückzuführen sind, immer nur Affektionen an den lichtzugänglichen Hautstellen hervorgerufen werden, die wiederum um so heftiger sein werden, je intensiver das Sonnenlicht und je weniger pigmentiert und geschützt die Haut ist.

v. Tappeiner, Raab u. a., die sich mit der Photodynamie befaßt haben, reden deshalb bei der Besprechung pathologischer Prozesse, die durch einen Farbstoff bedingt sein könnten, nur vom Pellagraerythem und vom Buchweizenexanthem, aber nicht von der Pellagra und dem Fagopyrismus. Die schweren intestinalen und nervösen Symptome, die bei beiden Krankheiten beobachtet werden, ließen jene Autoren mit Recht ganz unberücksichtigt.

Diese Erscheinungen bleiben in der Aetiologie so lange unaufgeklärt, als man den Farbstoff für die ausschließliche Ursache hält.

Wir müssen also annehmen, daß der Farbstoff, wenn er überhaupt ätiologisch wirksam ist, nur ein Adjuvans der eigentlichen Ursache (des Toxins) darstellt.

Die pellagrogene Wirkung des Mais besteht — das gleiche gilt bezüglich des Fagopyrismus von dem Buchweizen — in einer Intoxikation durch ein alkohollösliches Toxin (Zeïn) und in einer photobiologischen Sensibilisation durch den fluoreszierenden Farbstoff.

Die Pellagra und den Fagopyrismus können wir demnach im Gegensatz zu den einfachen Vergiftungen als „sensibilisierende Intoxikationskrankheiten“ bezeichnen. Die Benennung würde zum Ausdruck bringen, daß die so bezeichneten Krankheiten neben anderen Symptomen mit Hautaffektionen verlaufen müssen und durch Nahrungsmittel verursacht werden, die neben einem Toxin einen sensibilisatorisch wirksamen fluoreszierenden Farbstoff enthalten.

## Schlußsätze.

1) Die Maiskrankheit der Tiere und die Pellagra des Menschen scheinen identische Krankheiten zu sein.

2) Sie werden durch eine gemeinsame Ursache, ein alkohol-lösliches Toxin und den fluoreszierenden gelben Farbstoff, hervorgerufen.

3) Die Pellagra und der Fagopyrismus sind sensibilisierende Intoxikationskrankheiten.

## Literaturverzeichnis.

## A. Pellagra.

- Babes, Wiener klin. Wochenschr., 1907, No. 43, 46.  
 — und Sion, Die Pellagra. Nothnagels Sammelwerke.  
 Ballner, Oesterr. Sanitätswesen, 1910, No. 17—20.  
 Bertarelli, Centralbl. f. Bakt., Abt. I, Bd. 34.  
 Bezzola, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankheiten, Bd. 56, 1907.  
 Billod, Ann. de dermatol. et de Syphiligr., T. 10, 1899.  
 Camurri, Centralbl. f. Bakt., Abt. I, Orig., Bd. 53, 1910.  
 Casal, G., Historia natural y medica del principado de Asturias.  
 v. Deckenbach, Centralbl. f. Bakt., Abt. I, Bd. 45.  
 Deiaco, Wiener klin. Wochenschr., 1907, No. 32.  
 Fletcher, W., Journal of trop. Med. and Hyg., Vol. 12, 1909, No. 9.  
 Frapolli, Fr., Arimadversiones in morbum vulgo pellagram.  
 Friedberger und Fröhner, Handb. d. speziellen Pathologie u. Therapie.  
 De Giava, Manuale di Igiene Publica, 1882.  
 Horbaczewski, Oesterr. Sanitätswesen 1910, Beilage zu No. 31.  
 — Centralbl. f. Bakt., Orig., Bd. 58, 1911.  
 Kluszenko, Wiener klin. Wochenschr., 1908, No. 15.  
 Langstein, Verhandlg. deutscher Naturforscher u. Aerzte zu Meran, 1905.  
 Lode, Wien. klin. Wochenschr., 1910, No. 31.  
 Lombroso, La Pellagra. Uebersetzung von Dr. Kurella.  
 Luksch, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankheiten, Bd. 58, 1908.  
 Lupu, Wiener klin. Wochenschr., 1905, No. 26.  
 Lussana, Sulla pellagra.  
 Merk, Verhandlg. d. Ges. deutscher Naturforscher u. Aerzte zu Meran, 1905.  
 — Wiener klin. Wochenschr., 1906, No. 16.  
 Möller, Biblioth. medica, Abt. DII.  
 v. Neusser, Münch. med. Wochenschr., 1887.  
 Oehmke, Centralbl. f. Physiologie, 1909, No. 22.  
 Otto, M., Zeitschr. f. klin. Med., Bd. 19.  
 Paltauf und Heider, Wiener med. Jahrb., 1888.  
 Pellizi und Tirelli, Centralbl. f. Bakt., Abt. I, Bd. 16, 1894.  
 Raubitschek, Centralbl. f. Bakt., Orig., Abt. I, Bd. 57, 1910.  
 Raymond, Ann. de Dermatologie et de Syphiligr., T. 10, 1889.

Stoffela, De morbo nuncupato pellagra.

Sturli, Verhandlg. d. Gesellschaft deutscher Naturforscher und Aerzte zu Meran, 1905.

Tirelli, Centralbl. f. Bakt., Abt. I, Bd. 16. — Cf. auch Pellizi.

Tzoni, G., Centralbl. f. Bakt., Abt. I, Orig., Bd. 46, Heft 4.

Tuszek, Verhandl. d. Gesellschaft deutscher Naturforscher u. Aerzte, 1905.

#### B. Photodynamie.

Bie, V., Mitteilung aus Finsens Lichtinstitut von 1900 an.

Busck, G., Mitteilung aus Finsens med. Lichtinstitut, Bd. 8, 1904.

— Biochem. Zeitschr., Bd. 1, 1906.

— Mitteilungen aus Finsens med. Lichtinstitut, 1906.

— Mitteilungen aus Finsens med. Lichtinstitut, 1905, Heft 9.

Hausmann, W., Biochem. Zeitschr., Bd. 12, 1908.

— Biochem. Zeitschr., Bd. 14, 1908.

— und Kolmer, W., Biochem. Zeitschr., Bd. 15, 1908.

— Pringsheims Jahrbücher f. wiss. Bot., 1909.

— und Pribram, Biochem. Zeitschr., Bd. 17, 1909.

— und v. Portheim, L., Biochem. Zeitschr., Bd. 21, 1909.

— Wiener klin. Wochenschr., 1910, No. 36.

— Biochem. Zeitschr., Bd. 30, 1911.

Jodlbauer und Busck, Arch. internation. de Pharmacodyn. et de Thér., T. 15, 1905.

— Biochem. Zeitschr., Bd. 3, 1907.

— Jahrbücher über Leistungen und Fortschritte auf dem Gebiete der physikal. Medizin, 1908.

Karamitras, Sensibilisierung durch fluoreszierende Stoffe. Inaug.-Diss. München, 1907.

Pfeiffer, H., Wiener klin. Wochenschr., 1905, No. 9.

— Ebenda, No. 13.

v. Tappeiner, Münch. med. Wochenschr., 1909, No. 1.

— Münch. med. Wochenschr., 1904, No. 16.

— Ebenda, 1901.

— Die sensibilisierende Wirkung fluoreszierender Substanzen (Gesammelte Arbeiten), 1907.

— und Busck, G., Ueber die Wirkungen von Fluoreszeïn und Fluoreszeinderivaten im Licht und im Dunklen.

— Biochem. Zeitschr., Bd. 8, 1908.

— Ebenda, Bd. 12, 1908.

— Ebenda, Bd. 13, 1908.

*Nachdruck verboten.*

[Aus dem Karolinen-Kinderspital in Wien (Dirig. Primararzt  
Doz. Dr. Knöpfelmacher).]

### **Kutanreaktion und Komplement.**

Von Dr. **Felix Bauer**,  
Assistent des Spitals.

(Eingegangen bei der Redaktion am 15. März 1912.)

Die Frage, ob das Komplement für die anaphylaktische Reaktion notwendig sei, wird von der überwiegenden Mehrzahl der Autoren (Sleeswijk, Fleischmann und Michaelis, Friedberger und Hartoch, Doerr und Russ, Hartoch und Sirenskij) im bejahenden Sinne beantwortet. Beim Menschen hat Francioni Komplementschwund während der Serumkrankheit beschrieben. Dieser Befund ist mehrfach bestätigt und auch mir gelungen, wenn früh genug am Beginn der Serumkrankheit geprüft wurde, da die Verringerung bald normalen Verhältnissen weicht. Friedberger und Hartoch sowie Hartoch und Sirenskij haben durch Injektion von Kochsalzlösungen resp. durch schwere Trypanosomeninfektion Verringerung der anaphylaktischen Empfindlichkeit erzielt und beziehen diesen Befund auf die beobachtete Komplementverminderung. Dieser Auffassung ist, gegen Friedberger und Hartoch, vielfach mit guten Argumenten widersprochen worden, die auch gegen die Arbeit von Hartoch und Sirenskij, bei der auch die Geringfügigkeit der Komplementverminderung auffällt, gelten.

Ohne auf die Frage eingehen zu wollen, ob die Kutanreaktion des Menschen stets eine echt anaphylaktische Erscheinung ist, dürfen wir nach den erwähnten Befunden die Frage aufwerfen, ob ein Zusammenhang zwischen Kutanreaktion und Komplement besteht. Die Möglichkeit eines solchen Nachweises schien gegeben durch Komplementuntersuchung bei Menschen, die trotz sicher bestehender Sensibilisierung negative Kutanreaktion gegen das betreffende Agens, das früher positive ergab, zeigten. Wir wissen, daß die kutane Tuberkulinreaktion in den Spätstadien schwerer Tuberkulose häufig schwindet. Ebenso auch beobachten wir bei

schwer tuberkulösen kachektischen Individuen manchmal Komplementschwund. Ein Zusammenhang dieser beiden Phänomene schien von vornherein nicht unwahrscheinlich. Beim Tiere hat allerdings Schenk (Zeitschr. f. Immunitätsf., 1910) während des Ablaufes der Tuberkulinreaktion keinen Komplementverlust nachweisen können. Auch war die Kachexie der verwendeten, schwer tuberkulösen Meerschweinchen niemals von Komplementschwund begleitet. Dagegen glauben Wassermann und Citron, daß die Tuberkulinbindung unter Mitwirkung des Komplementes erfolge.

Meine Resultate bringt die folgende Tabelle. Die Komplementbestimmung geschah nach der allgemein üblichen Methode. Es wurde 5-proz. Hammelblut und vom Kaninchen stammendes Ambozeptorserum in dreifach lösender Dosis verwendet; das auszuwertende Serum wurde in Mengen von 0,005 bis 0,2 hinzugefügt und die Hämolyse nach 2 Stunden beurteilt. Neben dem geprüften Serum wurden stets zur Kontrolle mehrere Normalsera mituntersucht; es zeigte sich dabei, daß kleine Differenzen und Schwankungen im Komplementgehalt gesunder Menschen vorkommen, die jedoch weit geringer sind als die notierten Verringerungen. Wenn deutliche Hämolyse bei einer Serummenge von 0,02 bis 0,04 ccm auftrat, wurde der Komplementgehalt als normal bezeichnet, als vermehrt, wenn schon 0,01 wirksam war. Die Verringerungen sind in der Tabelle ausführlicher gekennzeichnet. Die notierte Kutanreaktion wurde genau nach Pirquetscher Vorschrift mit konzentriertem Alttuberkulin angestellt; unter „stark positiven“ (++) und „positiven Reaktionen“ (+) sind solche mit Rötung und mehr oder weniger starker Papelbildung verstanden, unter „kachektischen“ kleine, schwache, bläuliche Flecken mit sehr geringer oder ohne Papelbildung. Die Be-

Name, Diagnose	Pirquetsche Reaktion	Komplement
Bumbe: Meningitis tbc.	+	normal
Wessely: Meningitis tbc.	+	„
Grill: Meningitis tbc.	++	„
Krüger: Meningitis tbc.	27. XII. kachektisch	„
	31. XII. kachektisch	„
Schneider: Meningitis tbc.	kachektisch	vermehrt
Spekla: Meningitis tbc.	ø	normal
Kriwanek: Meningitis tbc.	24. XI. ø	vermehrt
	31. XI. ø	„
		32*

obachtung der Reaktionen dauerte mehrere Tage. Die angegebenen Krankheitsdiagnosen wurden stets am Obduktions-tische bestätigt.

Wir finden also in gleicher Weise bei positiver, kachektischer und negativer kutaner Tuberkulinreaktion in den angeführten Fällen normalen, manchmal etwas erhöhten Komplementgehalt.

Name, Diagnose	Pirquetsche Reaktion	Komplement
Grill: Meningitis tbc.	18. XII. ++ 20. XII. kachektisch	normal stark vermindert (Lyse bei 0,12: $\emptyset$ 0,15: +)
Wessely: Meningitis tbc.	12. XII. + 20. XII. kachektisch	normal "
Milutinovich: Tuberculosis	11. VI. + 17. VI. $\emptyset$ 18. VI. $\emptyset$	" " "

Eine Abnahme der Intensität der Pirquetschen Reaktion war also einmal von Komplementabnahme begleitet, ein anderes Mal und in einem Fall völligen Verschwindens der Reaktion blieb das Komplement erhalten.

Name, Diagnose	Pirquetsche Reaktion	Komplement
Benio: Pneumonia, Tbc. glandul. bronch.	19. XII. $\emptyset$ 20. XII. $\emptyset$	normal stark vermindert (Lyse bei 0,08: $\emptyset$ 0,1: +)

Hier ist die Reaktion schon bei noch normalem Komplement, ebenso wie zur Zeit des Schwundes negativ.

Zum Nachweis, daß auch die kleinen Schwankungen innerhalb der als normal bezeichneten Werte nicht der Intensität der Kutanreaktion entsprechen, folgt eine genaue Tabelle über gleichzeitige Prüfung verschiedener reagierender Fälle von tuberkulöser Meningitis in einer Versuchsreihe:

Menge des Komplement-serums	Bumbe von: Pirquet +	Milutinovich Pirquet: $\emptyset$	Schneider Pirquet: kachektisch	Normale Kontrolle
0,01	—	—	—	—
0,02	+	—	+	+
0,04	+	++	++	++
0,06	++	++	++	++
0,08	++	+++	+++	+++
0,1	++	+++	+++	+++
0,12	+++	+++	+++	+++

Bei 4 Masernfällen mit negativer Tuberkulinreaktion konnte ich ebenfalls keine Komplementverminderung finden.

Es besteht somit zwischen Komplementabnahme und Schwund der Tuberkulinkutanreaktion kein Zusammenhang.

Diese Untersuchungen werden ergänzt durch die folgenden Beobachtungen bei der Intrakutanreaktion mit Pferdeserum bei Serumkranken, deren echt anaphylaktische Art — zum Unterschied von der Tuberkulinreaktion — mir festzustehen scheint (F. Bauer, Monatsschr. für Kinderheilkunde, 1912).

	Intrakutan- reaktion	Komplement	Lyse
Hufnagel: schwere Serum- krankheit nach Injektion von 7 ccm Diphtherieserum	31. XI. + + 1. XII. + +	stark vermindert normal	0,08: $\emptyset$ , 0,1: + 0,01: $\emptyset$ , 0,04: +
Starkl: vor der Serumkrank- heit	28. XI. + +		
schwere Serumkrankheit	30. XI. $\emptyset$ 31. XI. $\emptyset$ 3. XII. $\emptyset$	geschwunden normal	0,2: $\emptyset$ 0,02: $\emptyset$ , 0,04 +

In drei anderen Fällen von Serumkrankheit war die Intrakutanreaktion stark positiv und nahm im Verlauf der Krankheit allmählich ab. Es besteht also auch hier kein Zusammenhang von Komplement und Kutanreaktion. Das dauernde Fehlen der Kutanreaktion in dem einen Fall läßt sich nicht durch den kurzwährenden Komplementschwund, sondern nur durch Annahme eintretender Antianaphylaxie erklären. Bemerkenswert ist, daß in diesem Fall beim Fehlen der Intrakutanreaktion mit Pferdeserum die kutane Tuberkulinreaktion unverändert positiv blieb.

### Zusammenfassung.

Die Kutan- resp. Intrakutanreaktion nach Tuberkulin und Pferdeserum beim empfindlichen Menschen ist unabhängig von der im Serum nachweisbaren Komplementmenge.

*Nachdruck verboten.*

## **The Use of Formalinized Sheep Cells in Complement-Fixation tests <sup>1)</sup>.**

By

**H. P. Bernstein, M. D.** and **David J. Kaliski, M. D.**

Pathologist to Lebanon Hospital and Associate in Clinical Pathology, Mt. Sinai Hospital.  
Assistant in Serum Research, Mt. Sinai Hospital and Assistant in Genito-Urinary Diseases, Mt. Sinai Hospital Dispensary, New York.

(Eingegangen bei der Redaktion am 16. März 1912.)

The original Wassermann reaction has been the subject of many modifications aimed either to increase its diagnostic accuracy or to simplify its technic. Of the latter, the one which has received the heartiest support of laboratory workers in this country is the modification introduced by Noguchi. This author appreciated the fact that a ready supply of fresh sheep corpuscles is not always within the reach of all institutions and workers in serology, and that an anti-human system would make the test universally available. His reaction has proved of inestimable value, especially to army posts and other laboratories so situated that a regular supply of fresh sheep-corpuscles could not be obtained.

We have succeeded to a great extent in obviating this disagreeable factor in the performance of the Wassermann reaction; and for those who still desire to use the anti-human system we have eliminated the frequent self-puncture necessary to obtain fresh human corpuscles.

We conceived the idea that by utilizing a substance which would sterilize and preserve the blood and perhaps also render the corpuscles more refractory to dissolution without interfering with hemolysis or fixation of complement we would have a method of distinct value to laboratory workers. This was our aim in conducting the following experiments.

The first problem concerned itself with the question whether formalin when added to sheep-cells would influence

---

1) From the Pathological Laboratory of the Mount Sinai Hospital.



the result of the Wassermann reaction. Formalin was selected as the most promising antiseptic on account of its known sterilizing action on beef-blood for use in bacteriological work<sup>1</sup>).

To solve this we collected blood in the usual way at the abattoir, and to every four hundred cubic centimeters of blood added one half cubic centimeter of formalin (40 volume strength). This mixture was then put in the ice-box for storage. Twice each week some of this formalinized blood (1—800) was washed three time with 0.9% NaCl solution and tested parallel with the regular supply of fresh normal blood. The regular Wassermann test was applied using the sera sent to the laboratory for diagnosis.

Altogether 116 sera were tested with both fresh and formalinized sheep-cells. Of these 39 were positive and 77 negative with both series, the results corresponding in every detail. The degree of fixation of complement was identical in both series. (Table I.) We noted that the blood retained its normal scarlet color for a period of about two months, the period during which the above experiments extended.

Table I.

	Fresh Corpuscles		Formalinized C.	
	+	—	+	—
Lues cases	39	0	39	0
Normal Controls	0	77	0	77

The cause of this extremely long preservation may be explained by the following hypotheses: first, that the formalin fixes the albuminous material of the stroma or cell-membrane or both; and secondly, that the addition of the formalin preserves the blood from the deleterious action of bacterial growth. Non-formalinized cells kept under similar conditions are rarely useful for longer than four to seven days. In order to obtain the longest possible period of preservation, the stock supply of formalinized cells should be kept in as aseptic a manner as possible.

1) Bernstein and Epstein, Journal Infections Diseases, Vol. 3, 1906, p. 772.

Inasmuch as the addition of formalin to the sheep-cells in the above concentration (1—800) did not interfere with the Wassermann reaction we next concerned ourselves with the problem of determining the amount of formalin that could be added without harmful effect.

To solve this we added increasing amounts of formalin, from 1—800 to 1—25, to fresh sheep-cells, and found that the addition of formalin in concentrations of from 1—800 to 1—200 did not interfere with hemolysis, the varying strengths of the drug apparently showing no influence on the degree or rapidity of laking. In greater strength than 1—200 the cells were fixed in a more or less compact mass and could not be readily emulsified<sup>1</sup>).

To determine whether the addition of ammonium oxalate to the blood for the purpose of preventing coagulation would change the results we proceeded as follows. Four hundred cubic centimeters of sheep-cells was collected into two flasks one of which contained a one per-cent ammonium oxalate solution and the other a sufficient number of glass-beads to permit of defibrination. At the laboratory formalin was added to each in the strength of 1—800 and hemolytic tests made within twenty-four hours and repeated over a period of eight weeks. It was found that the oxalated and defibrinated bloods showed no apparent difference in their relation to hemolysis.

Having thus eliminated the question of preserving sheep cells, we next turned our attention to the possibility of avoiding the inconvenience of daily washing cells for the tests. To determine this point we washed a quantity of fresh cells three times and then added formalin in the strength of 1—240 (arbitrarily selected) and an equal bulk of 0.9% NaCl solution, thus making a 50% emulsion of washed formalinized sheep-corpuscles. These cells were tested immediately and at inter-

1) In all our experiments the hemolytic system consisted of the following: complement — 0.5 c. c. of a 10% emulsion of fresh guinea-pig serum; hemolytic amboceptor, — two units; cells. — 0.5 c. c. of a 5% emulsion of sheep-corpuscles in 0.9% NaCl solution. Necessary controls were employed throughout. Tests were incubated for 30 minutes in a water bath at 38° C. Reading were made at the end of this period and after twenty four hours.

vals of two weeks, being made up to five per-cent by a further addition of salt solution at the time of performing the tests. It was found that the washed cells could be preserved for at least three to four weeks.

The question whether formalinized cells could be employed for obtaining a specific amboceptor was decided by injecting a rabbit intraperitoneally at intervals of five days with washed formalinized cells in increasing amounts (from four to twenty cubic centimeters). At the time of the first injection the cells were already fifteen days old; and the same stock was used throughout. Ten days after the fourth injection the rabbits serum showed a titre of 1—8000.

The effect of varying concentrations of formalin on the hemolytic system was now determined by adding the drug in strengths of from 0.1 c. c. to 0.01 c. c. of a ten per-cent solution to the hemolytic system. It was found that the addition of 0.1 c. c. to 0.06 c. c. caused complete inhibition of hemolysis; that in dilution of from 0.06 c. c. to 0.02 c. c. there was a varying degree of inhibition; while 0.01 c. c. and less showed complete hemolysis. (Table II.)

Table II.

	10 % Formalin	Fresh washed sheep cells	NaCl solution 0,9-proz.	10 % Emul- sion fresh guinea pig Complement	Hemolytic Ambocep- tor 0,1 = I unit	Result
1	0.5 c. c.	0.5 c. c.	0.0 c. c.	0.5 c. c.	0.2 c. c.	no hemolysis
2	0.4 "	idem		idem	idem	idem
3	0.3 "	"		"	"	"
4	0.2 "	"		"	"	"
5	0.1 "	"		"	"	"
6	0.09 "	"		"	"	"
7	0.08 "	"		"	"	"
8	0.07 "	"		"	"	"
9	0.06 "	"		"	"	"
10	0.05 "	"		"	"	trace of hemoly- sis
11	0.04 "	"		"	"	idem
12	0.03 "	"		"	"	almost complete hemolysis
13	0.02 "	"		"	"	idem
14	0.01 "	"		"	"	compl. hemol.

The effect of formalin on the component parts of the hemolytic system was then determined by adding it to fresh sheep-cells, complement, and amboceptor respectively in

strengths of 1—300 and 1—160. Cross tests were also made with formalinized and fresh ingredients in various combinations. (Table III.)

Table III. (Formalin 1:300.)

	Cells	Amboceptor	Complement	15 min. in water bath at 37° C	After 24 hrs. in ice box		15 min. in water bath	After 24 hrs. in ice box
1	form'd cells	fresh amboc.	fresh compl.	c. h.	c. h.	ingredients in ice box for 48 hrs. and tested similarly	c. h.	c. h.
2	idem	form'd amboc.	idem	c. h.	c. h.		c. h.	c. h.
3	"	idem	form'd compl.	almost c. h.	almost c. h.		slight h.	slight h.
4	"	fresh amboc.	idem	almost c. h.	almost c. h.		slight h.	slight h.
5	fresh cells	form'd amboc.	fresh compl.	c. h.	c. h.		c. h.	c. h.
6	idem	idem	form'd compl.	c. h.	c. h.		slight h.	slight h.
7	"	fresh amboc.	idem	almost c. h.	almost c. h.		slight h.	slight h.

Fresh washed sheep corpuscles + Formalin (washed diluted with 0.9% NaCl + 0.5%) 1:300 — 1:160

Fres guinea-pig complement + Formalin (diluted to 10% by addition of 0.9% NaCl) 1:300 — 1:160

Concentrated anti-sheep amboceptor + Formalin (diluted with 0.9% NaCl + 2 units added) 1:300 — 1:160

Table III a. (Formalin 1:160.)

	Cells	Amboceptor	Complement	After 15 min. at 37° C	After 24 hrs. in ice box
1	form'd cells	fresh amboc.	fresh compl.	c. h.	c. h.
2	idem	form'd amboc.	idem	no h.	no h.
3	"	idem	form'd compl.	no h.	no h.
4	"	fresh amboc.	idem	no h.	no h.
5	fresh cells	form'd amboc.	fresh compl.	slight h.	slight h.
6	idem	idem	form'd compl.	no h.	no h.
7	"	fresh amboc.	idem	no h.	no h.

c. h. = complete hemolysis; no h. = no hemolysis; slight h. = slight hemolysis.

The addition of formalin in strength of 1—300 to fresh sheep-cells is without effect on the reaction if untreated complement is used. Formalinized amboceptor is likewise uninfluenced in this concentration, while complement is only slightly affected in this concentration immediately, showing faint inhibition of hemolysis. Similar tests were made with ingredients treated as above and preserved in the ice-box for 48 hours, thus allowing the formalin to act for a greater period of time. These showed that the cells and amboceptor

were still uninfluenced, whereas the complement was almost completely destroyed. A portion of the complement used in these tests, untreated and preserved in the ice-box, was still quite active after 48 hours.

In concentration of 1—160 the cells were uninfluenced, the amboceptor was only slightly lessened in strength, while complement was rapidly and almost totally destroyed.

The above experiments with sheep's blood naturally led us to determine the influence of formalin on the preservation of human cells. Up to date we have had opportunity of making very few experiments along this line, but we have succeeded in preserving human blood (kept from clotting by the addition of 1 % sodium citrate) for at least four weeks by the addition of formalin in the strength of 1—400. These cells are also available for the production of a specific amboceptor.

#### Zusammenfassung.

1) Formalin in Konzentration von 1:800 bis 1:200 konserviert Blut auf wenigstens 8 Wochen für die Komplementbindungsmethode.

2) Die Spezifität der Komplementfixation wird durch die Benutzung solchen formalinisierten Materials nicht beeinflusst.

3) Ammoniumoxalat und Natriumzitrat kann bei der Herstellung des formalinisierten Zellmaterials zur Verhinderung der Gerinnung benutzt werden.

4) Formalin in einer geringeren Konzentration als 1:300 dem hämolytischen System zugesetzt, schädigt weder Zellen noch Amboceptor und hat nur eine sehr minimale, schädigende Wirkung auf das Komplement. In stärkeren Konzentrationen wird der Amboceptor in geringerem Grade geschädigt, das Komplement zerstört.

5) Gewaschene Blutkörperchen halten sich wenigstens 3—4 Wochen mit Formalin versetzt und sind stets ohne weiteres brauchbar.

6) Formalinisierte Zellen bewahren ihre antigene Qualität.

7) Menschliche Zellen verhalten sich ebenso wie Hammelzellen gegenüber dem Formalin.

*Nachdruck verboten.*

[Aus dem Hygienischen Institute in Graz (Vorstand:  
Prof. Dr. W. Prausnitz).]

### **Ueber den Einfluß von Leukocyten und Leukocyten- extrakten auf die Anaphylatoxinbildung.**

Von Dr. S. Miyaji aus Tokio (Japan).

(Eingegangen bei der Redaktion am 19. März 1912.)

Es ist eine bekannte Tatsache, daß die Leukocyten in der Immunitätswissenschaft eine große Rolle spielen. In der letzten Zeit haben die Studien über die Anaphylaxie eine neue Bahn in der Immunitätslehre eröffnet und dieses Phänomen ist von zahlreichen Forschern, besonders Friedberger und seinen Mitarbeitern, eingehend studiert worden. Dabei mußte es von Interesse sein, das Verhalten der Leukocyten bei der Bildung des anaphylaktischen Giftes in vitro und an sensibilisierten Tieren zu untersuchen.

Friedberger und Szymanowski<sup>1)</sup> kamen auf Grund ihrer Untersuchungen über den Einfluß der Leukocyten auf die Anaphylatoxinbildung im Reagenzglas zu dem Schlusse, daß die Leukocyten sowohl die Intensität der Anaphylatoxinbildung als die Wirkung des fertigen Anaphylatoxins abschwächen, halten es aber für möglich, daß in vivo eine Giftabspaltung auch noch innerhalb der Leukocyten stattfinden könnte. Massone<sup>2)</sup> kam in seiner Untersuchung über die giftzerstörenden Eigenschaften der Leukocyten zu Ergebnissen, die mit der Schlußfolgerung der letzteren Autoren übereinstimmen. Er folgert daraus, daß man den Leukocyten nicht nur als Vernichtern der Bakterien selbst, sondern auch als Giftzerstörern eine erhebliche Schutzwirkung zuschreiben muß.

Unsere eigenen Versuche wurden zu dem Zwecke unternommen, um festzustellen, ob außer einem Einfluß der Leukocyten und der Leukocytenstoffe auf die Giftbildung auch ein

1) XXIII. Mitteilung über Anaphylaxie. Zeitschr. f. Immunitätsf. u. experim. Therapie, Bd. 11, 1911, Heft 5.

2) Berliner klin. Wochenschr., 1911, No. 52.

solcher auf die mit Bacillen vorbehandelten sensibilisierten Tiere zu erkennen ist.

Zunächst folgten wir in den nachstehenden Versuchen der Friedbergerschen Vorschrift für die Giftabspaltung aus Bacillen und Komplement bzw. Bacillen, Komplement und Immunserum und haben wir die Bacillendosis, die mit einer bestimmten Menge von Komplement (3 ccm) eine toxische Dosis von Anaphylatoxin entstehen läßt, ermittelt.

### Versuchsordnung.

Als Bacterium benutzten wir Typhusbacillen und zum Teil Prodigiosusbacillen.

Die Leukocyten wurden wie folgt gewonnen: Ein gesundes Meerschweinchen erhielt ca. 15—20 ccm sterile Bouillon in die Bauchhöhle. Nach etwa 20 Stunden wurde 10—15 ccm sterile physiologische Kochsalzlösung intraperitoneal eingespritzt und nach der gleichmäßigen Verteilung durch Massage wurden die weißlich getrübten Exsudate mittelst einer Glaskanüle in die Eprouvetten, welche 3 ccm 1,5-proz. Natriumcitricumlösung enthielten, aufgenommen. Dann wurde diese Exsudatflüssigkeit zentrifugiert und noch 2mal mit physiologischer Kochsalzlösung ausgewaschen.

Leukocytenextrakt wurde folgendermaßen dargestellt:

I. Die von einem Meerschweinchen entnommenen Leukocyten wurden in je 1 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt. Diese Leukocytenaufschwemmung wurde 3mal im Frigo eingefroren, 3mal bei 37° C im Wasserbad wieder aufgetaut. Dann wurde sie im Schüttelapparat 24 Stunden geschüttelt und zentrifugiert. Dieses klare Zentrifugat wurde als Leukocytenextrakt gebraucht.

Auch noch in anderer Weise wurde Leukocytenextrakt gewonnen:

II. Möglichst dicke Leukocytenaufschwemmung (die von einem Meerschweinchen gewonnenen Leukocyten mit je 1 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt) im Frigo 3mal eingefroren, im 37° C Wasserbad 3mal wieder aufgetaut, dann im Mörser mit geringem Zusatz von Glassand verrieben, bis

eine dicke breiige Masse entsteht, zentrifugiert, mit diesem Zentrifugat experimentiert.

Bei unseren Versuchen wurden Meerschweinchen von 200—350 g stets in die Halsvene injiziert.

### I. Versuche in vitro.

#### Vorversuch 1 (ohne Leukocyten).

1—5 Oesen (Normalösen) Typhusbacillen und Prodigiosusbacillen in je 3 ccm frischen Meerschweinchenserum aufgeschwemmt, 2 Stunden bei 37° C, dann 12 Stunden im Eisschrank belassen, dann zentrifugiert; die obenstehende klare Flüssigkeit intravenös injiziert.

Tabelle I. (Versuch mit Typhusbacillus.)

Versuchstier	Bacillendosis	Komplement	Symptome
I	1 Oese	3 ccm	Zuckungen, Harn- und Kotabgang; bald erholt. Temperaturabfall 1,9° C; nach 2 Stdn. Normaltemperatur erreicht.
II	2 Oesen	3 ccm	Zuckungen, Harnabgang; bald erholt. Temperaturabfall 4,3° C; nach 5 Stdn. Normaltemperatur erreicht.
III	3 Oesen	3 ccm	Sofort nach der Einspritzung typische Krämpfe, Harn- u. Kotabgang. Nach 2 Min. gestorben.
IV	4 Oesen	3 ccm	Sofort nach der Injektion typische Krämpfe, Harn- u. Kotabgang. Nach 5 Min. gestorben.
V	5 Oesen	3 ccm	Sofort nach der Injektion Krämpfe, Harnabgang; nach 5 Min. erholt. Temperaturabfall 3,6° C; nach 3 Stdn. Normaltemperatur erreicht.

Tabelle II. (Versuch mit Prodigiosusbacillus.)

Versuchstier	Bacillendosis	Komplement	Symptome
I	1 Oese	3 ccm	Zuckungen, Harnabgang. Temperaturabfall 3,1° C; nach 3 Stdn. Normaltemperatur erreicht.
II	2 Oesen	3 ccm	Sofort nach der Einspritzung Krämpfe, tiefes Atmen; nach 7 Min. erholt. Temperaturabfall 5,3° C; nach 3 Stdn. Normaltemperatur erreicht.
III	3 Oesen	3 ccm	Sofort nach der Einspritzung typische Krämpfe, Harnabgang. Nach 2 Min. gestorben.
IV	4 Oesen	3 ccm	Sofort nach der Einspritzung typische Krämpfe. Nach 2 Min. gestorben.
V	5 Oesen	3 ccm	Zuckungen, Temperaturabfall 3,1° C; nach 4 Stdn. Normaltemperatur erreicht.



Vorversuch 2 (ohne Leukocyten).

1—5 Oesen (Normalösen) Typhusbacillen in 2 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt, mit je 0,2 ccm Typhusimmunserum versetzt. 2 Stunden im Brutschrank gehalten, dann die stark agglutinierten Bacillen zentrifugiert, mit physiologischer Kochsalzlösung ausgewaschen, wieder zentrifugiert, diesen mit Immunserum beladenen Typhusbacillen je 3 ccm Komplement hinzugefügt, 2 Stunden bei 37° C gehalten, 12 Stunden im Eisschrank belassen, zentrifugiert, die obenstehende klare Flüssigkeit intravenös injiziert.

Tabelle III. (Versuch mit dem mit ambozeptorbeladenen Typhusbacillus.)

Versuchstier	Bacillendosis	Immunserum	Komplement	Symptome
I	1 Oese	0,2 ccm	3 ccm	Keine Symptome.
II	2 Oesen	0,2 ccm	3 ccm	Keine Symptome.
III	3 Oesen	0,2 ccm	3 ccm	Zuckungen, Temperaturabfall 2,0° C; nach 1 Stde. Normaltemperatur erreicht.
IV	4 Oesen	0,2 ccm	3 ccm	Zuckungen, Temperaturabfall 5,6° C.
V	5 Oesen	0,2 ccm	3 ccm	Keine Symptome.

Man ersieht aus der vorstehenden Tabelle I, daß das akut wirkende Gift bei Digestion von 3 und 4 Oesen Typhusbacillen und Prodigiosusbacillen mit 3 ccm Komplement entstanden ist. Mit den mit Immunserum beladenen Typhusbacillen war jedoch, wie man aus Tabelle III ersieht, bei den eingehaltenen Mengenverhältnissen keine tödliche Giftwirkung zu erzielen. Diese Resultate stimmen mit den Versuchen von Friedberger und Goldschmid<sup>1)</sup> vollkommen überein. Wir haben deshalb bei unseren späteren Versuchen immer die unbeladenen Bacillen und als Grenzdosis des Giftes den Abguß der Aufschwemmung von 3—4 Oesen Typhusbacillen bzw. Prodigiosusbacillen in 3 ccm Komplement gebraucht.

Versuch 3 (mit Leukocyten).

Die Leukocyten wurden nach der vorher erörterten Methode gewonnen; mit Hilfe von physiologischer Kochsalzlösung wurde eine möglichst dicke Aufschwemmung gemacht (die von einem Meerschweinchen gewonnenen

1) XII.—XV. Mitteilung über Anaphylaxie. Zeitschr. f. Immunitätsf. u. experim. Therapie, Bd. 9, 1911, Heft 3.

Leukocyten gewöhnlich in 1 ccm Kochsalzlösung aufgeschwemmt), dann wurden 3—4 Oesen Typhusbacillen oder Prodigiosusbacillen in 3 ccm Komplement aufgeschwemmt, einige Tropfen der Leukocytenaufschwemmung hinzugefügt und gleichmäßig verteilt. Diese Bacillen-Leukocytenkomplementgemische wurden 2 Stunden bei 37° C und 12 Stunden im Eisschrank gehalten, dann zentrifugiert; die Zentrifugate intravenös eingespritzt.

Tabelle IV.

Versuchstier	Bacillendosis	Komplement	Symptome
(Versuch mit Typhusbacillus.)			
I	3 Oesen	3 ccm	Keine Krämpfe und Zuckungen. Kein Temperaturabfall.
II	4 Oesen	3 ccm	Keine Krämpfe und Zuckungen. Temperaturabfall 1,6° C; nach 1¼ Stde. Normaltemperatur erreicht.
(Versuch mit Prodigiosusbacillus.)			
I	3 Oesen	3 ccm	Zuckungen, Temperaturabfall 3,0° C.
II	4 Oesen	3 ccm	Nach der Einspritzung Krämpfe, Schaum aus Nase. Nach 3 Min. erholt. Temperaturabfall 1,8° C.

Wir haben Ausstrichpräparate und hängende Tropfen von den Bacillen-Leukocytenkomplementgemischen nach 2-stündigem Aufenthalt im Brutschrank angefertigt und bei mikroskopischer Untersuchung beobachtet, daß die Bilder der Phagocytose bei den Typhusbacillen viel deutlicher waren als bei den Prodigiosusbacillen. Diese Tatsache stimmt auch mit unseren Resultaten insofern vollkommen überein, als die tödlich wirkende Giftdosis bei Gegenwart von Leukocyten aus 3 bis 4 Oesen Typhusbacillen und Prodigiosusbacillen nicht mehr zu erhalten war und speziell das Gift aus dem Typhusbacillen-Leukocytenkomplementgemische verhältnismäßig schwächer war als das aus Prodigiosusbacillen gewonnene. Man könnte diese geringe Giftproduktion vielleicht mit der Verminderung der frei in der Flüssigkeit vorhandenen giftspaltenden Bacillen infolge der Phagocytose erklären.

Es ist schon aus dem Versuche 3 zu schließen, daß die Intensität der Giftbildung durch den Zusatz der Leukocyten verringert wird. Jetzt untersuchten wir die Wirkung der wie beim vorigen Versuch nach kurzer Zentrifugierung erhaltenen Bodensätze, welche aus den mit Bakterien beladenen Phago-

cyten, daneben aber auch aus wenigen freien Bakterien bestanden.

Versuch 4.

3—4 Oesen Typhusbacillen oder Prodigiosusbacillen in 3 ccm Komplement aufgeschwemmt, einige Tropfen der dicken Leukocytenaufschwemmung hinzugefügt, 2 Stunden bei 37° C, 12 Stunden im Eisschrank gehalten, dann kurz zentrifugiert; die Bodensätze mit physiologischer Kochsalzlösung ausgewaschen, dann mit der Kochsalzlösung auf 3 ccm aufgefüllt, durch Schütteln gleichmäßig aufgeschwemmt, intravenös injiziert.

Tabelle V. (Versuch mit Typhusbacillus.)

Versuchstier	Material zur Injektion	Symptome
I	Bodensätze aus 3 Oesen Bacillen u. Komplement mit Leukocyten	Leichte Zuckungen, Temperaturabfall 2,4° C; nach 2 Stdn. Normaltemperatur erreicht.
II	Bodensätze aus 4 Oesen Bacillen u. Komplement mit Leukocyten	Leichte Zuckungen, Temperaturabfall 1,4° C; nach 2 Stdn. Normaltemperatur erreicht.

Tabelle VI. (Versuch mit Prodigiosusbacillus.)

Versuchstier	Material zur Injektion	Symptome
I	Bodensätze aus 3 Oesen Bacillen u. 3 ccm Komplement mit Leukocyten	Leichte Zuckungen, Temperaturabfall 1,0° C; nach 2 Stdn. Normaltemperatur erreicht.

Wir haben bei mikroskopischer Untersuchung der Ausstrichpräparate beobachtet, daß die Phagocytose bei Typhusbacillen viel deutlicher ausgeprägt war. Die freien Bacillen blieben bei der kurzdauernden Zentrifugierung zum größten Teil in der überstehenden Flüssigkeit und wurden mit dieser abgessen. Wie man aus den Tabellen ersieht, zeigen die Versuchstiere Zuckungen und einen Temperaturabfall leichten Grades. Wenn dagegen Leukocyten allein injiziert werden, so zeigt das Tier keinen Temperaturabfall, sondern mehr oder minder starke Temperatursteigerung. Man könnte diesen Temperaturabfall durch Giftabspaltung aus den spärlichen freien Bacillen erklären. Immerhin war aber auch denkbar, daß er durch geringe Giftmengen, welche durch den Zerfall von bacillenhaltigen Phagocyten im Körper entstanden sein könnten, hervorgerufen sei.

Eine Reihe weiterer Versuche sollte die Rolle der Leukocytenstoffe bzw. der Leukocytenfermente bei dem Vorgange der Anaphylatoxinentgiftung feststellen. Zu diesem Zwecke wurde einerseits fertiges Anaphylatoxin mit Leukocytenextrakten digeriert, andererseits versucht, ob sich aus Bakterien, die gleichzeitig mit Leukocytenextrakten bebrütet wurden, Anaphylatoxin gewinnen läßt.

#### Versuch 5.

Leukocytenextrakt wurde nach der eingangs erörterten Methode II dargestellt.

1) 3—4 Oesen Typhusbacillen oder Prodigiosusbacillen in 3 ccm Komplement aufgeschwemmt, 2 Stunden bei 37° C gehalten, dann Leukocytenextrakt 0,5 ccm hinzugefügt, 12 Stunden im Eisschrank gehalten, dann zentrifugiert, Zentrifugat intravenös injiziert.

2) 3—4 Oesen Typhus- oder Prodigiosusbacillen in 3 ccm Komplement aufgeschwemmt, 0,5 ccm Leukocytenextrakt zugesetzt, 2 Stunden bei 37° C gehalten, 12 Stunden im Eisschrank, darauf zentrifugiert, die klare Flüssigkeit intravenös injiziert.

3) 3—4 Oesen Typhusbacillen oder Prodigiosusbacillen in 0,5 ccm Leukocytenextrakt aufgeschwemmt, 2 Stunden im Brutschrank gehalten, dann 3 ccm Komplement zugesetzt, 2 Stunden bei 37° C digeriert, 12 Stunden im Eisschrank, dann zentrifugiert, Zentrifugat intravenös eingespritzt.

4) Als Kontrolle der obigen Versuche: 3—4 Oesen Typhus- oder Prodigiosusbacillen in 3 ccm Komplement und 0,5 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt, 2 Stunden bei 37° C, dann 12 Stunden im Eisschrank gehalten, zentrifugiert, Zentrifugat intravenös injiziert.

Tabelle VII.

Versuchstier	Bacillendosis	Injektionsmaterial	Symptome
(Versuch mit Typhusbacillus.)			
I	3 Oesen	1	Krämpfe, bald gestorben
II	3 „	2	Krämpfe, gestorben
III	3 „	3	„ „
IV	3 „	4 (Kontrolle)	„ „
I	4 Oesen	1	Krämpfe, gestorben
II	4 „	2	„ „
III	4 „	3	„ „
IV	4 „	4 (Kontrolle)	„ „
(Versuch mit Prodigiosusbacillus.)			
I	4 Oesen	1	Deutliche Anaphylaxie, Tod
II	4 „	2	„ „ „
III	4 „	3	„ „ „
IV	4 „	4 (Kontrolle)	„ „ „

Wie man in diesen Tabellen sieht, sind alle Versuchstiere unter den typischen anaphylaktischen Erscheinungen zugrunde gegangen, was beweist, daß die Leukocytenextrakte keinen wesentlichen schädigenden Einfluß auf die Anaphylatoxinbildung hatten. Daß die Leukocyten an und für sich nicht imstande sind, aus Bakterien Anaphylatoxin entstehen zu lassen, zeigen die folgenden Versuche.

Versuch 6.

Leukocyten, welche von einem Meerschweinchen entnommen sind, mit je 2 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt, mit Typhus- oder Prodigiosusbacillen in verschiedenen Mengen vermischt, 2 Stunden bei 37° C gehalten, dann im Frigo 3mal eingefroren, 3mal in 37° C Wasserbad aufgetaut, zentrifugiert. Zentrifugat intravenös eingespritzt.

Tabelle VIII.

Versuchstier	Bacillendosis	Leukocyten- aufschwemmung	Symptome
(Versuch mit Typhusbacillus)			
I	1 Oese	2 ccm	keine Symptome
II	2 Oesen	dgl.	" "
III	3 "	"	" "
IV	4 "	"	" "
V	5 "	"	" "
(Versuch mit Prodigiosusbacillus)			
I	1 Oese	2 ccm	keine Symptome
II	2 Oesen	dgl.	" "
III	3 "	"	" "
IV	4 "	"	" "
V	5 "	"	" "

Man entnimmt aus dieser Tabelle, daß aus Leukocyten allein (ohne Serum) und Bacillen kein Gift entsteht. Die Phagocytose in den Ausstrichpräparaten nach 2-stündigem Aufenthalt im Brutschrank war in diesen Fällen übrigens recht spärlich. Doch ergab sich auch bei Zusatz von Immunsérum kein anderes Resultat, wie folgender Versuch zeigt.

Versuch 7.

1—5 Oesen Typhusbacillen mit 2 ccm Leukocytenaufschwemmung gemischt, 0,2 ccm Typhusimmunsérum hinzugefügt, 2 Stunden im Brutschrank gehalten, dann im Frigo 2mal eingefroren, im 37° C Wasserbad 2mal aufgetaut, kurz zentrifugiert. Zentrifugat intravenös injiziert.

Tabelle IX. (Versuch mit Typhusbacillus.)

Versuchstier	Bacillendosis	Immunserum	Leukocyten- aufschwemmung	Symptome
I	1 Oese	0,2 ccm	2,0 ccm	keine Symptome
II	2 Oesen	dgl.	dgl.	" "
III	3 "	"	"	" "
IV	4 "	"	"	" "
V	5 "	"	"	" "

Im Anschluß hieran haben wir auch nachfolgende Versuche mit den Bodensätzen, die aus Phagocyten und sensibilisierten Bakterien bestanden, gemacht. Nachdem Typhusbacillen (1—5 Oesen) -Leukocyten-Immunserungemische zwei Stunden bei 37° gehalten worden waren, zentrifugiert; die Bodensätze mit steriler physiologischer Kochsalzlösung ausgewaschen, dann 3mal eingefroren, im Wasserbad bei 37° C 3mal aufgetaut, im Mörser mit geringen Zusatz von Glassand verrieben, zentrifugiert. Zentrifugat intravenös injiziert.

Infolge des Zusatzes von Immunserum war die Phagocytose sehr deutlich ausgeprägt, aber auch in diesen Fällen keine Gifterscheinungen (Krämpfe, Temperaturabfall etc.) zu konstatieren.

## II. Versuch in vivo.

Zu den Versuchen in vivo wurden sensibilisierte Meerschweinchen benutzt.

Ein Teil der Meerschweinchen wurde mit 0,002 g (1 Normalöse) abgetöteter Typhusbacillen subkutan injiziert, nach 15 Tagen reinjiziert. Andere Meerschweinchen wurden 10 Tage lang täglich mit 0,0002 g ( $\frac{1}{10}$  Normalöse) abgetöteter Typhusbacillen subkutan injiziert, nach 20 Tagen reinjiziert. Wir haben diese sensibilisierten Meerschweinchen mit den folgenden Materialien reinjiziert:

- a) mit Typhusbacillen allein,
- b) mit Typhusbacillen und Leukocyten,
- c) mit Leukocyten allein,
- d) mit Typhusbacillen und Leukocytenextrakt I.

Diese Versuche wurden unternommen, um festzustellen, welche Einflüsse Leukocyten und Leukocytenextrakt auf die aktive Anaphylaxie ausüben. Die Gemische von dicker Leukocytenaufschwemmung 3 ccm und Bacillen oder von Leuko-

cytenextrakt 3,0 ccm und Bacillen wurden bei 37° C 2 Stunden gehalten, durch Schütteln gleichmäßig verteilt, dann intravenös eingespritzt.

Versuch 8.

Tabelle X. (Versuch mit Leukocyten.)

Ver- suchs- tier	Bacillen- menge zur Reinjektion	Leuko- cyten	Symptome
I	0,1	ohne	Nach der Reinjektion sofort typische Krämpfe; gestorben.
II	0,1	mit	Keine Krämpfe und Zuckungen, Körpertemperatur allmählich bis 25,4° C abgesunken; nach 3 <sup>3</sup> / <sub>4</sub> Stdn. gestorben.
III	0,15	ohne	Sofort nach der Injektion Krämpfe; gestorben.
IV	0,15	mit	Keine Krämpfe, Temperatur langsam; bis 25° C abgefallen; nach 5 <sup>1</sup> / <sub>4</sub> Stdn. zugrunde gegangen.
V	0,2	ohne	Sofort typische Krämpfe; gestorben.
VI	0,2	mit	Keine Krämpfe, Temperaturabfall 27,4° C; nach 5 <sup>3</sup> / <sub>4</sub> Stdn. gestorben.
VII	0,4	ohne	Typische Krämpfe; gestorben.
VIII	0,4	mit	Ohne Krämpfe, Temperaturabfall bis 31,2° C; nach 2 Stdn. gestorben.
IX	ohne	mit	Keine Krämpfe und Zuckungen; kein Temperaturabfall, sondern mehr oder minder Temperatursteigerung.

Tabelle XI. (Versuch mit Leukocytenextrakt.)

Ver- suchs- tier	Bacillen- menge zur Reinjektion	Leuko- cyten	Symptome
I	0,15	ohne	Nach der Reinjektion Krämpfe, Sprünge; nach 20 Min. gestorben.
II	0,15	mit	Krämpfe, Zuckungen; nach 30 Min. gestorben.
III	0,2	ohne	Krämpfe. Sprünge; nach 20 Min. gestorben.
IV	0,2	mit	Krämpfe, Zuckungen; nach 20 Min. gestorben.

Wie man in diesen Tabellen sieht, gehen die sensibilisierten Versuchstiere bald unter den typischen anaphylaktischen Erscheinungen zugrunde, wenn man mit Bakterien allein reinjiziert. Wenn man dagegen Bacillen mit Leukocytenaufschwemmung intravenös einspritzt, so zeigen die Tiere keine typischen Krämpfe, Zuckungen usw. Sie gehen nur unter lang-

samem Temperaturabfall zugrunde. Leukocytenextrakte dagegen wirken nicht auf die Giftbildung im Körper hemmend ein.

Wir können diese Erscheinungen wohl darauf zurückführen, daß die Giftabspaltung aus den Bacillen in der Leukocytenemulsion nur langsam erfolgt. Da die Leukocytenextrakte nämlich keine merkliche hemmende Wirkung erkennen ließen, so ist anzunehmen, daß die Leukocyten die Giftabspaltung aus den Bakterien nur mechanisch behindern, zum Teil infolge der Phagocytose, zum Teil weil die Bakterien sich häufig in der Peripherie der Leukocyten ansammeln und infolge denen der Wirkung des Serums weniger zugänglich sind. Es haben diese Versuchsergebnisse eine gewisse Aehnlichkeit mit den Befunden von Stenström<sup>1)</sup>, der fand, daß die Anwesenheit von Leukocyten infolge der gesteigerten Phagocytose die durch Injektion von Typhusbacillen hervorgerufene Antikörperbildung (Agglutinin, Bakteriolyse) herabsetzt.

#### Zusammenfassung.

Es geht aus unseren Versuchen hervor:

- 1) Beim Vorhandensein von Leukocyten wird in vitro weniger anaphylaktisches Gift gebildet.
- 2) Aus Leukocyten und Bacillen allein entsteht kein Gift.
- 3) Auch aus Leukocyten, Bacillen und inaktivem Immunsérum wurde unter den eingegangenen Mengenverhältnissen kein Gift gebildet. Bacillen, welche phagocytiert werden, spalten kein Gift innerhalb der Leukocyten ab.
- 4) Bei der Bildung des anaphylaktischen Giftes in vivo haben die Leukocyten einen merkbar verzögernden Einfluß auf den Verlauf der Krankheitserscheinungen.
- 5) Leukocytenextrakte haben weder in vitro noch in vivo Wirkung auf die Entstehung des anaphylaktischen Giftes.

---

Herrn Paul Th. Müller spreche ich für die Anregung und freundliche Unterstützung meinen ergebensten Dank an dieser Stelle aus.

---

1) Zeitschr. f. Immunitätsf. u. exper. Therapie, Bd. 8, 1911, p. 483.



*Nachdruck verboten.*

[Aus dem Königl. Institut für Infektionskrankheiten zu Berlin  
(Direktor: Geh. Obermed.-Rat Prof. Dr. Gaffky; Abt.-Vorsteher:  
Geh. Med.-Rat Prof. Dr. v. Wassermann).]

## **Versuche über Isolierung des bakteriolytischen Immunkörpers.**

Von Dr. med. Nicolas Ssobolew.

(Eingegangen bei der Redaktion am 20. März 1912.)

Versuche, die Immunsubstanzen aus dem Serum zu isolieren und in möglichster Reinheit darzustellen, sind von vielen Autoren vorgenommen worden, die beabsichtigten, erstens die chemische Natur der Immunsubstanzen näher zu erforschen und zweitens der Lösung der Frage der Konzentration derselben näher zu kommen. An der Hand der Literatur, die sich auf dieses Thema bezieht, kann man sich überzeugen, daß die auf diesem Gebiete gewonnenen Resultate sich bis zu einem gewissen Grade der Lösung der erwähnten Frage nähern.

So fand Pick, indem er die Methode der Aussalzung mit Ammoniumsulfat anwendete, daß die Immunsubstanzen bestimmter Sera zusammen mit einem bestimmten Eiweiß ausfielen. So fielen die Immunsubstanzen beispielsweise aus Pferdediphtherieserum zusammen mit dem Pseudoglobulin aus, während sie aus dem Ziegenserum zusammen mit dem Euglobulin ausfielen. Die Versuche, die Immunsubstanzen vom Eiweiß durch Alkoholbehandlung abzusondern, führten zu einem Mißerfolg, indem bei der Reinigung mit dem Eiweißgehalt auch die Wirksamkeit des Präparates stets abnahm. Desgleichen ergab auch in bezug auf das Diphtherieserum die Methode der Trypsinverdauung ein negatives Resultat, da durch letztere zwar der größte Teil des Eiweißes gespalten wurde, zugleich aber auch  $\frac{2}{3}$  des Antitoxins vernichtet wurden.

Bereits früher fällten Pfeiffer und Proskauer mittels Magnesiumsulfat die Globuline des Choleraserums, mit denen sämtliche Immunsubstanzen ausfielen, während die Serumalbumine, wie es mittels des Pfeifferschen Experimentes nachzuweisen gelang, vollkommen unwirksam waren. Ihre weiteren Manipulationen, welche das Eiweiß zu isolieren bezweckten und in der Anwendung von Alkohol, Aether, Aceton, Chloroform, Glyzerin, ferner in der Anwendung einer das Eiweiß koagulierenden hohen Temperatur, sowie der peptischen bzw. pankreatischen Verdauung bestanden, ergaben keine positiven Resultate, da hierbei großer Verlust oder sogar vollständige Vernichtung der Immunsubstanzen beobachtet wurde.

Brieger und M. Krause gelang es im Jahre 1907, aus dem Diphtherieserum 75 Proz. des Gesamtstickstoffes zu entfernen, ohne daß die immunisierende Kraft des Serums geschädigt wurde. Dies geschah in der Weise, daß das Diphtherieserum mit destilliertem Wasser zu gleichen Teilen verdünnt, mit Ammoniumsulfat gefällt, der Niederschlag mit 10-proz. wässriger Glyzerinlösung aufgenommen und mit Kochsalz ausgesalzt wurde. Der Niederschlag enthielt kein Antitoxin, und die Lösung hatte ihren ursprünglichen Heilwert. Die weiteren Versuche mit Reinigung und Konzentration ergaben jedoch keine bestimmten Resultate.

Die Methode von M. Frouin basiert gleichfalls auf der Ausscheidung des Eiweißes aus dem Serum und besteht darin, daß man zum Serum bis 2—5 Proz. Glyzerin hinzufügt, dasselbe hierauf mit Kochsalz aussalzt, filtriert und dann 10—15 Minuten lang über dem Wasserbade der Einwirkung einer Temperatur von 75—80° aussetzt. Nach der Abkühlung versetzt man das geronnene Serum mit 2—3 Volumina halbkonzentrierter Kochsalzlösung und bringt dann dasselbe zur Maceration für die Dauer von 12—48 Stunden in den Eisschrank. Diese Maceration wird bis zu dreimal wiederholt, wobei das geronnene Serum jedesmal mit frischer Kochsalzlösung versetzt wird. Sämtliche Flüssigkeiten werden nach vorangehender Dekantation dialysiert und dann im luftleeren Raum bei einer Temperatur von ca. 35° bis zum früheren Serumvolumen konzentriert. Nach den Angaben von Jacqué und Zunz, die diese Methode in bezug auf das Diphtherieserum und das antihämolytische Cobraserum anwendeten, gelingt es den größten Teil der Proteine zu entfernen, während die nach der Konzentration gewonnene Flüssigkeit mindestens bis  $\frac{3}{4}$  Immuns-substanzen des Serums enthält.

Hata hat die physikalische Methode des Gefrierens mit nachfolgender Auftauung des Serums, d. h. die Methode des Rossischen Kolloidtrennungsvorgangs zur Konzentrierung der wirksamen Substanzen im Serum angewendet. Bei dieser Methode erweist sich die obere Schicht als kolloidfrei, die mittlere enthält Kolloide in mäßiger Quantität, während in der unteren Schicht sich die ganze Kolloidmasse samt den Immuns-substanzen anhäuft. Hata empfiehlt diese Methode bei schwachen Immunsera anzuwenden, um ihre Wirkung zu steigern. Der Mangel dieser Methode besteht jedoch darin, daß gleichzeitig mit der Konzentration der Immuns-substanzen auch die ganze Kolloidmasse konzentriert wird.

Nachdem Calmette, v. Wassermann und Morgenroth die Reversibilität der Verbindung von Toxin mit Antitoxin festgestellt hatten (Calmette machte durch Erhitzung einer neutralen Mischung von Schlangengift und Antitoxin bis 68° die Mischung wieder giftig, v. Wassermann erhielt dasselbe Resultat bei Erhitzung einer neutralen Mischung von Pyocyaneustoxin mit Pyocyaneusantitoxin, Morgenroth erzielte, indem er zu neutralen Mischungen von Cobragift bzw.

von Diphtherietoxin mit deren Antitoxinen schwache Salzsäurelösung hinzufügte, Spaltung der Verbindungen und Wiederfreierwerden des Toxins), begann man die Immunsubstanzen aus ihrer Verbindung mit den entsprechenden Antigenen zu isolieren.

Hahn und Trommsdorff behandelten agglutinierte Bakterien mit  $\frac{1}{100}$  Normalnatronlauge und  $\frac{1}{100}$  Normalschwefelsäure und konnten einen gewissen, wenn auch unbedeutenden Anteil des gebundenen Agglutinins wieder in Freiheit setzen und wirksam machen.

Morgenroth zeigte, daß, wenn man mit Ambozeptor beladene, gewaschene rote Blutkörperchen mit hämolysinfreien Blutkörperchen desselben Tieres vermischt, nach Hinzufügung von Komplement die Lösung nicht nur der beladenen, sondern auch der unbeladenen Blutkörperchen eintritt. Aus diesem Versuch geht hervor, daß die roten Blutkörperchen die Fähigkeit besitzen, einmal gebundenen Ambozeptor an die umgebende Flüssigkeit zum Teil wieder abzugeben.

Landsteiner, Landsteiner und Jagic haben nachgewiesen, daß in physiologischer Kochsalzlösung gewaschene agglutinierte Bakterien und agglutinierte Blutkörperchen, wenn sie wieder in physiologische Kochsalzlösung gebracht werden, einen Teil der verankerten Agglutinine abgeben. Die Menge des wieder abgegebenen Agglutinins ist von der Temperatur insofern abhängig, als bei höherer Temperatur (bis 50°) mehr abgegeben wird als bei niedriger.

Daß in die physiologische Kochsalzlösung nicht nur gebundene Agglutinine, sondern auch Präzipitine übergehen, haben gleichfalls Landsteiner und Jagic nachgewiesen. Sie fällten Rinderserum mittels präzipitierenden Kaninchenserums, wuschen den Niederschlag und erwärmten ihn in physiologischer Kochsalzlösung bis 50°. Nach vorangehender Zentrifugierung wurde zu der klaren Flüssigkeit Serum hinzugesetzt und im Resultat deutliche Präzipitation beobachtet.

Müller hat aus dem Laktoserumpräzipitat das Präzipitin wenigstens zum Teil wiedergewonnen. Der sorgfältig gewaschene Niederschlag wurde mit verdünnter Essigsäure angesäuert, nach einstündigem Stehen zentrifugiert, die gewonnene opaleszierende Flüssigkeit neutralisiert, worauf sich nach Milchezusatz nach 1 Stunde einen weißen Niederschlag absetzte. Durch Essigsäure läßt sich somit das Präzipitin in wirksamer Form extrahieren.

Was die bakteriolytischen Substanzen betrifft, so injizierten Pfeiffer und Friedberger in die Bauchhöhle eines Meerschweinchens Cholera-vibrionen, die mit Immunserum zuvor sensibilisiert und von den Ueberresten des wirksamen Serums durch sorgfältiges Waschen befreit wurden, und fanden, daß in der Bauchhöhle vollständige Bakteriolyse nicht nur der sensibilisierten Cholera-bakterien, sondern auch der neu injizierten, in keiner Weise vorbehandelten Cholera-vibrionen eintrat.

Bail, Tsuda und W. Spät haben die Experimente von Pfeiffer und Friedberger bestätigt und ebenso wie Landsteiner und Jagic zeigen können, daß an Choleravibrionen gebundene Immunkörper nicht nur im Organismus des Tieres, sondern auch außerhalb desselben abgespalten werden können, und zwar mittels einer indifferenten Kochsalzlösung bei einer Temperatur von 40—42°, und daß auch Sera verschiedener Tiere jene Verbindung zu spalten vermögen.

Dieselben Resultate hat auch Tsuda erhalten, und zwar nicht nur mit bakteriolytischem Choleraserum, sondern auch mit agglutinierendem, präzipitierendem und hämolytischem Serum. Tsuda konnte ebenso wie Landsteiner und Reich bzw. Eisler nachweisen, daß mit Immuns-substanzen, die im normalen Serum enthalten sind, sensibilisierte Antigene ihr wirksames Agens weit leichter und in relativ größeren Quantitäten an die physiologische Kochsalzlösung wieder abgeben als mit Immunserum bearbeitete Antigene, welche nur einen geringen Teil der Immuns-substanzen an die Lösung abgeben können.

Liebermann und Fenyvessy gelang es mit Hilfe von verdünnter Salzsäure ( $\frac{1}{100}$  normal), die an die roten Blutkörperchen gebundenen Immunkörper abzuspalten. Die auf diese Weise erhaltenen Lösungen wirkten stark agglutinierend und hämolytisch. Die Wirkungen der Extrakte waren spezifisch. Diese Lösungen erwiesen sich selbst den empfindlichsten Eiweißreagentien gegenüber als eiweißfrei und waren nicht dialysabel. Liebermann rät, die Konzentration der Säuremenge nicht zu überschreiten, da die Säure unzweifelhaft zu Zerstörung der Immuns-substanzen führt, und zwar mehr zu Zerstörung der hämolytischen als der agglutinierenden Stoffe.

Nachdem eine Reihe von Autoren, wie Landsteiner und Reich, Zangger, Biltz, Nernst, Bredig usw. gefunden hatten, daß Immunkörperreaktionen mit den Adsorptionerscheinungen nahe Verwandtschaft besitzen, und daß zwischen Immunkörperverbindungen und den Adsorptionsverbindungen der anorganischen Kolloide eine Analogie geführt werden könne, begann man die Adsorptionerscheinungen gründlich zu studieren, um auf diese Weise das Wesen und die Gesetze der Toxin-Antitoxinverbindungen näher kennen zu lernen.

Indem sie Adsorption mit Kolloiden verschiedener Eiweißsubstanzen, Toxine und Serumantikörper (Antitoxin, Agglutinin, Bakteriolyisin) erzeugten, haben Biltz, Much und Siebert, Andrejew, Landsteiner, Uhlich und Reich gefunden, daß die adsorbierende Wirkung der Kolloide auf die Stoffe vielfach ausgesprochen elektiv ist, und daß zwischen der Wirkung elektropositiver und elektronegativer Kolloide oft ein Gegensatz besteht. Dieselben Autoren haben auch den Nachweis ge-

führt, daß die Adsorption der Eiweißstoffe des Serums mit der Adsorption der Antikörper nicht parallel geht.

Natürlich mußte die Frage der Reversibilität der Verbindung des Kolloids mit den Immunsubstanzen des Serums entstehen. Was die Eiweißsubstanzen betrifft, so haben viele Autoren, darunter auch L. Michaelis, festgestellt, daß mit Albumosen beladene Kohle, Mastix, Eisenhydroxyd, Kaolin usw. irreversibel sind. Die Autoren gelangen zu dem Schlusse, daß die Irreversibilität der Eiweißadsorption von eintretender Denaturierung des Eiweißes abhängt.

Besonderes Interesse bieten die Experimente von L. Michaelis mit Fermenten dar. Er fällte aus Hefe das Ferment Invertin durch eine bestimmte Quantität Eisenhydratoxyd. Das Invertin wurde ganz adsorbiert, so daß das Filtrat vollkommen frei von Ferment war. Diese Adsorptionsverbindung des Invertins mit Eisenhydroxyd wurde mit Wasser geschüttelt, ohne daß sich ein sicherer Uebergang des Ferments in das Wasser nachweisen ließ. Wenn aber der Niederschlag selbst mit Saccharoselösung versetzt wurde, so enthielt die nach einigen Minuten abzentrifugierte Flüssigkeit reichlich invertierten Zucker. Das Ferment brauchte also nicht in Lösung zu sein, um seine Wirkung zu entfalten, sondern behielt auch in adsorbiertem Zustande seine Wirksamkeit. Andererseits fällte L. Michaelis Hefeextrakt mit Kaolin und fand, daß letzteres das Ferment gar nicht adsorbiert, gleichzeitig aber das Eiweiß zum Ausfallen bringt. Der Autor gelangt zu dem Schlusse, daß das Kaolin ein vorzügliches Mittel zur Reinigung und Klärung des Invertins ist.

Was die Versuche betrifft, Toxin und Immunsubstanzen aus deren Verbindungen mit Kolloiden zu isolieren, so sind in dieser Beziehung vor allem die Experimente von Biltz, Much und Siebert zu erwähnen, die Diphtherietoxin mit Eisenhydroxyd adsorbierten, den Niederschlag von Filtratspuren reinigten und einem Meerschweinchen injizierten, wobei aber das Resultat negativ ausfiel.

So blieb die Frage der Reversibilität der Verbindung von Toxin mit Kolloid offen, da man zwei Eventualitäten gelten lassen konnte: erstens, daß das Gift durch die Behandlung in eine auch im Tierkörper unlösliche Form übergeführt worden sei, oder zweitens, daß es sich um eine durch Kolloide bewirkte Beschleunigung der Zersetzung der Giftkörper handele.

Daß hier nicht von Inversibilität im allgemeinen, sondern nur von Inversibilität einem gewissen Kolloid gegenüber die Rede sein kann, beweisen die Experimente von Ferdinand Dauwe. Dieser Autor adsorbierte Pepsin mit verschiedenen Kolloiden und fand, daß man, wenn das Pepsin mit Talk, Kieselgur, Serumeiweiß, Fibrin, Kasein usw. gefällt wurde, Pepsinwirkung sowohl im Filtrat als auch im vom Filtrat sorgfältig gewaschenen Niederschlag nachweisen konnte, während der Niederschlag, wenn auf das

Pepsin mit Magnesium carbonicum, Calcium carbonicum eingewirkt wurde, Pepsineinwirkung nicht aufwies.

Der Autor möchte diese Erscheinung darauf zurückführen, daß es sich hier um eine gänzliche oder partielle Zerstörung des Pepsins handelt, sei es, daß die geringe Löslichkeit dieser Salze hinreicht, um durch alkalische Reaktion das Pepsin zu zerstören, sei es, daß sich unlösliche und unwirksame Calcium- bzw. Magnesiumsalze bilden.

Im Jahre 1909 haben Jacqué und Eduard Zunz in ihrer Arbeit „Recherches sur l'adsorption des toxines, des lysines et de leurs anticorps“ nachgewiesen, daß das Diphtherietoxin durch Tierkohle vollständig adsorbiert wird, während andere Kolloide, wie Kaolin, Talk, Kieselgur usw. das Diphtherietoxin zu adsorbieren nicht imstande sind. Im Gegensatz zu den Beobachtungen von Biltz, Much und Siebert haben die Autoren, indem sie eine gewaschene Mischung von mit Tierkohle adsorbiertem Toxin in die Bauchhöhle eines Meerschweinchens injizierten, Reversibilität dieser Verbindung konstatieren können, während das Tier unter Erscheinungen von Diphtherievergiftungen zugrunde ging, wenn auch die Autoren anerkennen, daß die Vergiftungserscheinungen später eintraten und bisweilen nicht besonders stark ausgeprägt waren.

Immerhin konstatieren sie, daß der Organismus des Meerschweinchens imstande ist, eine Abspaltung des mit Kolloid adsorbierten Toxins herbeizuführen.

In Anbetracht des Umstandes, daß Morgenroth das Toxin aus seiner Verbindung mit Antitoxin durch Zusatz von schwacher Säure zur neutralen Mischung hat wiedergewinnen können, machten die Autoren den Versuch, eine Verbindung von Toxin mit Tierkohle mit Hilfe der Säure wieder zu trennen, erzielten aber negative Resultate; die Injektion des sauren Filtrates fügte dem Versuchstier keinen Schaden zu. Desgleichen waren weder destilliertes Wasser noch normales Pferdeserum noch Diphtherieserum imstande, das Toxin aus seiner Verbindung mit Kolloid zu isolieren.

Was das antitoxische Diphtherieserum betrifft, so haben die von den Autoren angewendeten, gleichen, adsorbierenden Mittel wie für das Toxin, die Immunsubstanzen des Serums nicht adsorbieren können. Sobald aber die Autoren eine größere Eiweißmenge nach der oben beschriebenen Methode von M. Frouin aus dem Serum entfernten, konnten die Immunsubstanzen durch Tierkohle vollständig adsorbiert werden. Diese Verbindung hat sich als relativ gut reversibel erwiesen, da sie, wenn sie mit verdünnter physiologischer Kochsalzlösung in Berührung gebracht wurde, an dieselbe einen Teil ihrer Immunsubstanzen abgab, deren Vorhandensein daraus erhellte, daß dieses Serum Meerschweinchen vor der schädlichen Einwirkung des nachträglich injizierten Diphtherietoxins schützte. Desgleichen konnte auch Diphtherietoxin und destilliertes Wasser, wenn auch in schwächerem Grade, Antitoxin von dessen Verbindung mit Kolloid abspalten.

Andererseits ist es auffallend, daß die Verbindung von Antitoxin mit Tierkohle, in die Bauchhöhle eines Meerschweinchens injiziert, das letztere bei nachfolgender Injektion von Diphtherietoxin vor dem Tode nicht zu retten vermochte. Trotzdem also die Verbindung von Antitoxin mit Tierkohle außerhalb des Organismus leicht getrennt werden konnte, fand innerhalb des Organismus eine Abspaltung von Antitoxin nicht statt. Die von Jacqué und Zunz erhobenen Befunde sind insofern von Interesse, als sie darauf hinweisen, daß die Verbindung von Toxin oder Immuns substanz mit adsorbierendem Kolloid unter gewissen, für jede Verbindung feststehenden Bedingungen reversibel erscheint.

Von den letzteren Experimenten von Jacqué und Zunz ausgehend, schien es möglich, Immuns substancen aus deren Verbindung mit adsorbierendem Kolloid zu isolieren, indem man das Serum von Eiweiß möglichst befreite.

Auf Anregung des Herrn Geheimrat Prof. v. Wassermann machte ich diese Frage zum Gegenstand spezieller Studien. Als Objekte für meine Arbeit verwendete ich Typhus- und Choleraserum, die von Kaninchen gewonnen wurden. Es sollten zwei Aufgaben gelöst werden. Erstens sollte ein Kolloid gefunden werden, welches nicht nur möglichst sämtliche Immuns substancen aus dem Serum adsorbierte, sondern obendrein gestattete, mittelst irgendeines Verfahrens die Immuns substancen in reinerem Zustande zu gewinnen, d. h. mit anderen Worten: dies Kolloid müßte eine bis zu einem gewissen Grade reversible Verbindung liefern.

Zu diesem Zwecke experimentierte ich mit Kolloiden, die sich nach den Angaben der Literatur als fähig erwiesen haben, Immuns substancen des Serums zu adsorbieren, und zwar Kaolin, Kieselsäure und Eisenhydroxyd. Als Hauptbedingung einer besseren Adsorption der Immuns substancen des Serums seitens des Kolloids gilt, wie Andrejew, Biltz, Much, Siebert, L. Michaelis u. a. nachgewiesen haben, eine genügende Verdünnung des Serums mit physiologischer Kochsalzlösung, da mit der Zunahme der Konzentration des Serums die Fähigkeit des Kolloids, Immuns substancen zu adsorbieren, merklich nachläßt. Zu diesem Zwecke haben wir bei unseren experimentellen Untersuchungen das Typhus- bzw. Choleraserum im Verhältnis von 1:50 verdünnt, was, wie die Kontrollversuche ergaben, vollständig ausreichend war. Die Adsorption selbst, d. h. das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein von Immun-

substanzen im Filtrat nach der Fällung des Serums durch Kolloide wurde in vitro mittelst Agglutination, Präzipitation und Komplementbindung sowie in vivo mittelst des Pfeiffer'schen Versuches geprüft. Das bei den Experimenten zu verwendende Filtrat mußte durch längere Zentrifugierung von den kleinsten Kolloidpartikelchen befreit sein, da das Vorhandensein derselben im Filtrat selbstverständlich ein falsches Resultat in bezug auf die Adsorption des betreffenden Kolloids hätte geben müssen, weil die in das Filtrat hineingelangten Kolloidpartikelchen in Verbindung mit den Immunsubstanzen natürlich positive Agglutinations-, Präzipitationsreaktion usw. geben können, was sich bei meinen weiteren Experimenten bei der Kontrolle auch als zutreffend erwies. Besonders schwer war es, das Filtrat von den kleinsten Eisenhydroxyd- bzw. Kaolinpartikelchen zu befreien und es vollkommen klar zu machen. Zu diesem Zwecke war andauernde Zentrifugierung (3—4 Stunden lang bei 2000 Umdrehungen in der Minute) erforderlich. Sowohl in bezug auf das Typhusserum als auch in bezug auf das Choleraserum hat sich als das die Immunsubstanzen am besten adsorbierende Kolloid das Eisenhydroxyd erwiesen. Mit diesem Kolloid gelang es, sämtliche Immunsubstanzen aus dem Typhusserum zu adsorbieren, sofern als Beweis dafür gelten darf, daß das, wie oben beschrieben, durch andauernde Zentrifugierung bearbeitete Filtrat mit Typhusbakterien keine Agglutinationsreaktion und mit wässrigem Extrakt von Typhusbakterien keine Präzipitationsreaktion bzw. Komplementbindung gab. Fast dasselbe konnte man auch in bezug auf das Choleraserum konstatieren. Das nach der Fällung des Serums mit Eisenhydroxyd verbliebene Filtrat bewirkte, wenn es mit Bouillon in einer Verdünnung von 1:5 und mit Cholera bacillen in die Bauchhöhle eines Meerschweinchens injiziert wurde, keine Bakteriolyse und schützte die Tiere nicht vor dem Tode. Was die Agglutination betrifft, so trat dieselbe zwar bis zu einer Verdünnung des Filtrates von 1:400 ein. Immerhin aber war in Betracht des Umstandes, daß das Choleraserum selbst Cholera bacillen in einer Verdünnung von 1:30 000 agglutinierte, der Agglutinationswert von 1:400 so minimal, daß er um so



weniger in Betracht kommen konnte, als der Pfeiffersche Versuch ein negatives Resultat ergab.

Die Hauptbedingung einer möglichst vollständigen Adsorption der Immunsubstanzen seitens des Kolloides ist, von der oben erwähnten Verdünnung des Serums mittelst physiologischer Kochsalzlösung abgesehen, die Quantität des Kolloids, welches dem Serum zugesetzt wird. Schon L. Michaelis und Ehrenreich konstatierten in ihrer Arbeit über die „Adsorptionsanalyse der Fermente“, daß es ein gewisses Optimum für das Ausfallen eines maximalen Niederschlages gibt, und daß in einem Ueberschuß von Eisenhydroxyd sich die Fällungen wieder lösen. Man mußte sich hiervon überzeugen, wenn man zu dem reichlichen Niederschlag, der sich unter dem Einflusse des Eisenhydroxyds gebildet hatte, einen Ueberschuß des letzteren hinzufügte, was zur Folge hatte, daß sich das Volumen des Niederschlages merklich verringerte und das Filtrat durch den Eisenüberschuß in der Lösung sich dunkelbraun färbte. Man mußte also empirisch die Eisenhydroxydmenge feststellen, die erforderlich war, um das Optimum der Fällung der Immunsubstanzen aus dem Serum zu erzielen und sich dieser Quantität in den weiteren Experimenten bedienen. Zu diesem Zwecke lösten wir Ferrum oxydatum dialysatum in destilliertem Wasser in einer Verdünnung von 1:20 und fügten zu 1 ccm des mit physiologischer Kochsalzlösung 1:50 verdünnten Serums 3 ccm der soeben erwähnten Eisenhydroxydlösung hinzu. Durch eine Reihe von Kontrollexperimenten mit Typhus- bzw. Cholera-serum überzeugten wir uns, daß diese Quantität des zum Serum hinzuzufügenden Eisenhydroxyds mehr oder minder dem Fällungsoptimum entsprach, da in dem von den kleinsten Kolloidpartikelchen sorgfältig abzentrifugierten Filtrat Immuns-substanzen entweder überhaupt nicht oder nur in geringfügiger Quantität vorhanden waren.

Was das Kaolin betrifft, so haben wir zum Zwecke der Adsorption verschiedene Mengen desselben angewendet und eine relativ geringe Verringerung der Immuns-substanzen im Filtrat konstatiert. Desgleichen hat auch die Kieselsäure sowohl per se als auch in verschiedenen Verdünnungen nicht

den Adsorptionseffekt geliefert, der bei Anwendung von Eisenhydroxyd erzielt wurde.

Die Anordnung war sowohl bei der Prüfung des Kolloids auf seine Adsorptionskraft als auch bei allen folgenden Experimenten über Adsorption der Immunsubstanzen durch Eisenhydroxyd die folgende: Nach Hinzufügung einer bestimmten Kolloidmenge zu dem bis zum Verhältnis von 1:50 verdünnten Serum wurde die ganze Flüssigkeit im Glaskolben 10 Minuten lang sorgfältig geschüttelt und dann für 1 Stunde in den auf 37° eingestellten Brutschrank gebracht, wobei die Flüssigkeit auch während des Aufenthaltes im Brutschrank mehrere Male geschüttelt wurde.

Nachdem wir auf diese Weise eine möglichst vollständige Adsorption der Immunsubstanzen des Serums mittelst Eisenhydroxyds erzielt hatten, mußten wir die zweite Frage, nämlich diejenige der Reversibilität dieser Verbindung, lösen. Bevor wir aber den Versuch machten, die Immunsubstanzen aus der Eisenverbindung zu isolieren, mußten wir nachweisen, daß die Immunsubstanzen in dieser Verbindung vorhanden und durch das Kolloid selbst nicht zerstört waren. Für diesen Zweck war der Pfeiffersche Versuch am besten geeignet. Nachdem wir in der oben beschriebenen Weise aus 1 ccm Typhus- bzw. Choleraserum, welches mittelst physiologischer Kochsalzlösung im Verhältnis von 1:50 verdünnt war, mit Eisenhydroxyd die Adsorption bewirkt hatten, zentrifugierten wir die Mischung, gossen die Flüssigkeit vom Niederschlag ab, wuschen den letzteren durch sorgfältiges Schütteln mit 40 ccm destillierten Wassers, um den Niederschlag von den Serumspuren zu reinigen, zentrifugierten wieder und wiederholten die Waschung mit nachfolgendem Zentrifugieren 5—6mal, um die Reinheit des Niederschlages möglichst zu gewährleisten. Das letzte Waschwasser wurde zur Kontrolle bei der Ausführung des Pfeifferschen Versuches verwendet, wobei es bei Verdünnung mit Bouillon im Verhältnis von 1:5 ein negatives Resultat ergeben mußte, d. h. in der Bauchhöhle eines Meerschweinchens Bakteriolyse der entsprechenden Bakterien nicht erzeugen durfte. Die auf diese Weise gewonnenen gewaschenen Niederschläge wurden nun zu den Versuchen verwendet. Die Niederschläge wurden, wie es mit den Seris

bei der Ausführung des Pfeifferschen Versuches zu geschehen pflegt, mit Bouillon verdünnt, wobei bei der Verdünnung des Niederschlages diejenige ursprüngliche Serummenge in Betracht gezogen wurde, von der der Niederschlag gewonnen worden war. In vorliegendem Falle nahmen wir an, daß der von 1 ccm Immunserum gewonnene Niederschlag der Quantität der in 1 ccm des ursprünglichen Serums enthaltenen Immunmenge entspricht.

In Anbetracht des Umstandes, daß der Niederschlag in der Bouillon rasch auf den Boden des Reagenzgläschens niederfiel, mußte man vor der Entnahme einer gewissen Sedimentmenge in der Bouillon zum Zwecke der weiteren Verdünnung den Niederschlag durch Hineintreibung von Luft in die auf den Boden des Reagenzgläschens gesenkte Pipette stets schütteln, um eine gleichmäßige Mischung zu erhalten.

Zur Kontrolle wurde außer dem oben bereits erwähnten Waschwasser in einer Verdünnung mit Bouillon im Verhältnis von 1:5 sowie außer der reinen Bouillon noch der Niederschlag genommen, der durch Adsorbierung von normalem Kaninchenserum mit Eisenhydroxyd gewonnen war, und mit Bouillon im Verhältnis von 1:50 verdünnt.

Die mit Bouillon verdünnten Sedimente wurden in Quantitäten von je 1 ccm zusammen mit den entsprechenden Bakterien in der Menge von je einer Normalöse Meerschweinchen in die Bauchhöhle injiziert.

Es ergab sich, daß die durch Adsorption mit Eisen aus Typhus- bzw. Choleraimmunserum gewonnenen Niederschläge in der Bauchhöhle des Meerschweinchens mit den entsprechenden Bakterien Bakteriolyse gaben, wobei die Intensität dieser Bakteriolyse immerhin geringer war als diejenige der ursprünglichen Sera. So gab der vom Typhusserum gewonnene Niederschlag vollständige Bakteriolyse nur in einer Verdünnung von 1:50 und schützte zugleich das Tier vor dem Tode, während das ursprüngliche Immuntyphusserum Bakteriolyse in einer Verdünnung von 1:400 gab. Der durch Adsorption von Choleraserum gewonnene Niederschlag gab mit den entsprechenden Cholera Bakterien Bakteriolyse nur bis zu einer 2—3000-fachen Verdünnung des Niederschlages, während

das ursprüngliche Immuncholeraserum Bakteriolyse in einer Verdünnung von 1:30000 gab. Was die Kontrollexperimente mit dem Spülwasser in einer Verdünnung mit Bouillon im Verhältnis von 1:5 sowie mit dem durch Adsorption von normalem Kaninchenserum gewonnenen und mit Bouillon im Verhältnis von 1:50 verdünnten Niederschlag betrifft, so wurde bei denselben Bakteriolyse mit den entsprechenden Bakterien nicht beobachtet und die Meerschweinchen gingen zugrunde, während die Tiere bei der Injektion von Niederschlägen aus den Immunsera, bei denen Bakteriolyse beobachtet wurde, am Leben blieben.

Aus diesen Experimenten geht somit hervor, daß die Immunsubstanzen in mit Eisenhydroxyd adsorbierten Niederschlägen vorhanden und imstande sind, das Tier vor der schädlichen und verderblichen Wirkung der Typhus- und Cholerabakterien zu schützen; die Wirkungskraft dieser Niederschläge ist jedoch bedeutend geringer als die des ursprünglichen Serums.

Letztere Tatsache kann durch zwei Hypothesen erklärt werden. Erstens ist es möglich, daß der Organismus nicht imstande ist, sämtliche Immunsubstanzen aus deren Verbindung mit Eisen zu isolieren; zweitens dadurch, daß ein Teil der Immunsubstanzen immerhin durch das Kolloid geschädigt wird, worauf, wie oben erwähnt, Ferdinand Dauwe in seinen Experimenten mit Fermentadsorption hinweist.

Nachdem wir die Tatsache des Vorhandenseins von Immunsubstanzen in der Verbindung mit Eisenhydroxyd festgestellt und einen bestimmten Reversibilitätsgrad dieser Verbindung im Organismus des Tieres nachgewiesen haben, machten wir es uns zur Aufgabe, diese Immunsubstanzen aus deren Verbindung mit dem Kolloid wieder frei zu bekommen.

Zunächst erprobten wir die physikalische Methode. Der Niederschlag wurde mit physiologischer Kochsalzlösung versetzt und für die Dauer von 24 Stunden in den auf 37° eingestellten Brutschrank gebracht, ohne daß es jedoch gelang, in der Flüssigkeit Immunkörper nachzuweisen. Statt mit physiologischer Kochsalzlösung wurde der Niederschlag mit destilliertem Wasser versetzt und ceteris paribus gleichfalls in den Brutschrank gebracht, aber wiederum ohne Erfolg.

Die Erwärmung des Niederschlages samt der physiologischen Kochsalzlösung in dem Wasserbade bei einer Temperatur von 40—80° ergab gleichfalls kein positives Resultat. Der Niederschlag wurde samt dem destillierten Wasser bzw. der physiologischen Kochsalzlösung für die Dauer von einigen Tagen in den Schüttelapparat gebracht, worauf die Flüssigkeit auf das Vorhandensein von Immunkörpern untersucht wurde, ohne daß jedoch letztere gefunden wurden. Schließlich wurde Dialyse in destilliertes Wasser, in Kochsalzlösung von verschiedener Konzentration angewendet, oder man versetzte den Niederschlag mit Kochsalzlösungen verschiedener Konzentration und dialysierte das Ganze in destilliertes Wasser, aber wiederum ohne Erfolg.

Wir gingen dann zur chemischen Isolierungsmethode über, wobei wir vor allem schwache Säuren und Alkalien erprobten, indem wir an die Experimente von Hahn und Trommsdorff dachten, denen es gelang, mittelst schwach alkalischer oder schwach saurer Lösungen aus agglutinierten Bakterien einen gewissen Teil agglutinierender Substanzen zu isolieren, desgleichen an die Experimente von Liebermann und Fenyvessy, die mittelst  $\frac{1}{100}$  Normalsalzsäure eine gewisse Quantität agglutinierender und hämolytischer Substanzen isoliert haben, die mit roten Blutkörperchen verbunden waren.

Zu diesem Zwecke wurde zunächst eine Lösung von  $\frac{1}{100}$  Normalsalzsäure erprobt, mit welcher der Niederschlag versetzt und dann für die Dauer von einigen Stunden bis zu einigen Tagen in den Schüttelapparat gebracht wurde. Nach dem Zentrifugieren wurde die Flüssigkeit mit  $\frac{1}{100}$  NaOH neutralisiert und in Verdünnungen mit Bouillon im Verhältnis von 1:2 bzw. von 1:5 samt den entsprechenden Bakterien in die Bauchhöhle eines Meerschweinchens injiziert, es kam aber ein unbestimmtes Resultat heraus, da bisweilen, namentlich in den Experimenten mit Extrakt von Typhusserumniederschlag, in einer Bouillonverdünnung von 1:2 Bakteriolyse beobachtet wurde, bisweilen jedoch auch nicht. Die von uns erprobten stärkeren und schwächeren Säurekonzentrationen ergaben gleichfalls keine positiven Resultate. Selbst wenn man annimmt, daß die Säure bis zu einem gewissen Grade imstande ist, Immunkörper aus deren Verbindungen mit

Kolloiden zu isolieren, so muß man mit der Behauptung Liebermanns und Fenyvessys übereinstimmen, daß dieselbe die Immunsustanzen auch zerstört. Die Anwendung von  $\frac{1}{100}$  Normal-NaOH bzw. Natrium carbonicum statt Säure ergab kein positives Resultat.

Die Versuche, die Verbindung von Kolloid mit Immunsorum der physiologischen Wirkung der Trypsinverdauung auszusetzen, in der Hoffnung, daß das Trypsin, nachdem es die Eiweißsubstanzen verdaut hat, die Immunsustanzen wird frei werden lassen, haben sich als erfolglos erwiesen.

Es blieb nun noch die biologische Methode zu erproben. Sobald es erwiesen war, daß in der Bauchhöhle eines Meerschweinchens im Beisein von entsprechenden Bakterien aus einer Verbindung von Immunsorum mit Eisen bakteriolytische Immunkörper sich abspalten, schien die Annahme gerechtfertigt, daß diese Verbindung, in die Bauchhöhle eines Meerschweinchens injiziert, ohne Bakterien an und für sich dissoziiert werden kann. In der Tat konnten wir, indem wir zur Adsorption mit Eisenhydroxyd-Cholerasorum, welches an Immunkörpern besonders reich war, übergingen und den sorgfältig gewaschenen Niederschlag samt 5 ccm Bouillon in die Bauchhöhle eines Meerschweinchens injizierten, uns überzeugen, daß nach Verlauf von 10—14 Stunden das aus der Bauchhöhle des getöteten Meerschweinchens entnommene, mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnte und abzentrifugierte Exsudat Immunkörper enthält und Bakteriolyse hervorzurufen vermag, wenn es zusammen mit Choleravibrien in die Bauchhöhle eines Meerschweinchens injiziert wird. Um der eventuellen Einwendung zu begegnen, daß das Exsudat des Meerschweinchens an und für sich die Bakteriolyse beeinflussen könne, haben wir, so unwahrscheinlich es auch schien, in die Bauchhöhle eines Meerschweinchens 5 ccm Bouillon zusammen mit Aleuronat injiziert. Nach 14 Stunden wurde das Meerschweinchen getötet, die Bauchhöhle mit 40 ccm physiologischer Kochsalzlösung ausgewaschen, die Flüssigkeit, um einer Gerinnung derselben vorzubeugen, rasch in die Zentrifuge gebracht und hierauf in einer Verdünnung mit Bouillon im Verhältnis von 1:2 in die Bauchhöhle eines

neuen Meerschweinchens zusammen mit Choleravibrionen injiziert. Bakteriolyse trat nicht ein, und das Tier ging rasch zugrunde. Indem wir die bakteriolytische Kraft des aus der Bauchhöhle eines Meerschweinchens gewonnenen Exsudats bestimmten, dem zuvor durch Adsorption von 1 ccm Choleraserum mit Eisenhydroxyd gewonnener Niederschlag injiziert war, fanden wir, daß das Exsudat noch in einer Verdünnung von 1:1000 (die ursprüngliche Verdünnung des Exsudats mit physiologischer Kochsalzlösung mit eingerechnet) deutliche Bakteriolyse der Cholerabacillen gab und das Meerschweinchen vor dem Tode schützte. Bei stärkeren Verdünnungen, wie beispielsweise bei solchen von 1:2000, wurde nur partielle Bakteriolyse beobachtet, und das Tier ging zugrunde.

Diese Versuche wurden mehrere Male mit stets gleichem Resultat wiederholt. Somit ist die Verbindung von Eisen mit Immunsrum in vitro unreversibel; wird sie aber durch den tierischen Organismus geführt, so wird sie reversibel. Mit anderen Worten: der tierische Organismus ist an und für sich imstande, jene Verbindung zu dissoziieren, wenn auch in etwas geringerem Grade als im Beisein von Antigen, d. h. von Cholerabacillen, wo Bakteriolyse, wie oben beschrieben, bei einer Verdünnung des Niederschlags von Choleraserum um das 2000—3000-fache beobachtet wurde.

Man konnte denken, daß der Grad der Dissoziation von der Größe oder von der Art des Tieres abhängt. In der Tat hat sich diese Annahme als gerechtfertigt erwiesen. Der gut gewaschene Niederschlag wurde zusammen mit Bouillon in die Bauchhöhle eines Kaninchens injiziert. Nach Verlauf von 14 Stunden wurde die Bauchhöhle mit 40 ccm physiologischer Kochsalzlösung ausgespült, die Flüssigkeit zentrifugiert, mit Bouillon verdünnt und zusammen mit Choleravibrionen in die Bauchhöhle eines Meerschweinchens injiziert. Es ergab sich, daß dieses vom Kaninchen gewonnene Exsudat vollständige Bakteriolyse gab, und zwar eine zweimal so starke Bakteriolyse wie das vom Meerschweinchen gewonnene Exsudat, d. h. bis zu einer Verdünnung im Verhältnis von 1:2000.

Aus unseren Erhebungen läßt sich somit ableiten, daß die Verbindung des Kolloids (Eisenhydroxyd) mit bakterio-

lytischem Choleraserum bis zu einem gewissen Grade reversibel ist. Die Dissoziation dieser Verbindung konnten wir jedoch nur im Organismus des Tieres, d. h. auf biologischem Wege, beobachten. Hierbei gelang es, die bakteriolytischen Immunkörper des Choleraserums, in der eiweißärmeren, exsudativen Flüssigkeit des Meerschweinchens und Kaninchens, wenn auch nicht ganz, zu isolieren.

### Zusammenfassung.

1) Der aus einem Immunserum (Typhus, Cholera) durch Behandlung mit Eisenhydroxyd gewonnene und durch sorgfältiges Waschen von jeder Spur Serums befreite Niederschlag enthält den spezifischen Immunkörper (positiver Ausfall des Pfeifferschen Versuches).

2) Eine Spaltung dieser Verbindung Eisenhydroxyd—Immunkörper in ihre beiden Komponenten ist nicht in vitro (physikalisch, chemisch), sondern nur im Tierorganismus auf biologischem Wege möglich.

3) Der so frei gewordene Immunkörper verleiht bei Uebertragung auf einen zweiten Tierorganismus diesen den spezifischen Immunschutz.

### Literatur.

- Andrejew, P., Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamt, Bd. 33, 1910, p. 84.  
 Bail und Tsuda, Wiener klin. Wochenschr., 1908, No. 51.  
 — — Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 1, 1909, p. 546 u. 772.  
 Biltz, Much und Siebert, Beitr. zur experim. Therapie von E. Behring, 1905, Heft 10, p. 30.  
 Brieger und Krause, M., Berliner klin. Wochenschr., 1907, No. 30.  
 Calmette, Annales de l'Institut Pasteur, T. 9, 1895.  
 Dauwe, F., Fr. Hoffmeisters Beitr., Bd. 6, 1905, p. 426.  
 Eisler, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 1, 1909, p. 297.  
 Eisenberg und Volk, Zeitschr. f. Hygiene, Bd. 40, p. 155.  
 Fränkel, S., Dynamische Biochemie, 1911, p. 529.  
 Frouin, A., Compt. rend. de la Soc. de Biol., T. 65, 1908, p. 444—445.  
 — Ibid., T. 65, p. 592—593.  
 Jacqué et Zunz, E., Arch. intern. de Physiol., Vol. 8, 1909, p. 227.  
 Hahn und Trommsdorff, Münchener med. Wochenschr., 1900, No. 13, p. 413.



- Hata, S., Centralbl. f. Bakt., Abt. I, Bd. 48, 1909, p. 203.  
 Landsteiner, Münchener med. Wochenschr., 1902, No. 46 und Wiener klin. Rundschau, 1902, No. 40.  
 — und Jagic, Wiener klin. Wochenschr., Bd. 17, 1904.  
 — Münchener med. Wochenschr., 1904, No. 51.  
 — Ibid., 1903, No. 18, p. 764.  
 — und Raubitschek, Biochem. Zeitschr., Bd. 15, 1909, p. 33.  
 — und Reich, Centralbl. f. Bakt., Bd. 39, 1905, p. 83.  
 Liebermann und Fenyvessy, Centralbl. f. Bakt., Bd. 47, 1908, p. 274.  
 Michaelis, L., Die Bindungsgesetze von Toxin und Antitoxin, Berlin 1905.  
 — Biochem. Zeitschr., Bd. 7, 1908, p. 488.  
 — Ibid., Bd. 12, 1908, p. 26 und Bd. 19, 1909, p. 181.  
 — Physikalische Chemie und Medizin. Handb. von Koranyi und Richter, Bd. 2, 1908.  
 — und Ehrenreich, Biochem. Zeitschr., Bd. 10, 1908, p. 283.  
 — und Rona, P., Ibid., Bd. 15, 1909, p. 196.  
 Morgenroth, Münchener med. Wochenschr., 1903, No. 2, p. 61.  
 — Berliner klin. Wochenschr., 1905, No. 50.  
 — und Willanen, Virchows Arch., Bd. 190, 1907, p. 371.  
 — und Pane, Biochem. Zeitschr., Bd. 1, 1906, p. 364.  
 Müller, P., Arch. f. Hygiene, Bd. 44, 1902, p. 126.  
 — Centralbl. f. Bakt., Bd. 46, 1908.  
 Pick, E., Beitr. zur chem. Physiol. u. Pathol. (Hofmeisters Beitr.), Bd. 1, 1902, p. 351.  
 Pfeiffer und Proskauer, Centralbl. f. Bakt., Bd. 19, 1896, p. 191.  
 — und Friedberger, Centralbl. f. Bakt., Orig., Bd. 34, 1903, p. 77.  
 Spaet, W., Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 7, 1910, p. 712.  
 Tsuda, K., Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 2, 1909, Heft 2, p. 225.  
 Wassermann, A., Zeitschr. f. Hygiene, Bd. 22, 1896, p. 263.  
 — Ibid., Bd. 18, p. 235.  
 Zangger, Centralbl. f. Bakt., Abt. I, Ref., 1905, p. 36.  
 — Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. I, 1909, p. 193—217.

*Nachdruck verboten.*

[From the Department of Experimental Pathology in Cornell University Medical College, under the Huntington Cancer Research Fund of the General Memorial Hospital, New York.]

### **"Vaccination" in Cancer.**

#### **I.**

#### **Vaccination in Human Cancer in the light of the experimental data upon normal tissue and tumor immunity.**

By **Arthur F. Coca.**

(Eingegangen bei der Redaktion am 24. März 1912.)

In relatively recent times the use of the term "vaccination" has been extended to apply to the injection of killed cultures of pathogenic bacteria for the purpose of artificially inducing an active immunity against the living organisms. This procedure has usually been resorted to as a therapeutic measure during a sub-acute or chronic infection by the respective microorganism, sometimes, however, during an acute infection or as a prophylactic measure, such as in typhoid, cholera und bubonic plague.

The rationale of this form of vaccination is as follows: it is assumed that in the course of a subacute or chronic bacterial infection the protoplasmic substances and excreted products of the micro-organisms find their way into the circulation of the infected individual in too small quantities to induce an immunity powerful enough to overcome the invaders; upon this assumption, therefore, it would seem theoretically correct artificially to supply to the body, in the manner referred to, the needed antigenic stimulus. The prophylactic immunization requires no special explanation.

If we inquire whether there are, in the literature dealing with the clinical and experimental study of malignant tumors and with the study of tissue cell immunity, any facts, which might justify the application of the vaccination therapy to the treatment of malignant disease in human beings, we find that such facts do exist in abundance.

### Normal Tissue Immunity.

Von Dungern<sup>1)</sup> first demonstrated an immunity to tissue cells, with the production of cytolytic antibodies, for which purpose he used the tracheal epithelium of the ox. Whether these cytolytic antibodies were different from the hemolytic antibodies, which von Dungern was able also to demonstrate in the animal immunized against tracheal epithelium, cannot be determined with certainty from his experiments. The bearing of the studies upon the problem of tumor immunity was pointed out in von Dungern's publication.

Landsteiner<sup>2)</sup>, Metchnikoff<sup>3)</sup> and Moxter<sup>4)</sup> were able to produce specific spermotoxic sera by the injection of the spermatozoa of foreign species, and Metchnikoff<sup>5)</sup> was able to demonstrate a specific autospermotoxic serum in the guinea-pig after injecting testicular tissue derived from other guinea-pigs. One of the most striking of Metchnikoff's observations was of the fact that the testicular tissue of the animal whose blood contained a spermotoxin capable of destroying its own spermatozoa in vitro was not attacked in situ by the spermotoxin. Finally, Adler<sup>6)</sup>, in von Dungern's laboratory, obtained an autospermotoxic serum by injecting an emulsion of the animal's own testis, which had been removed by operation. Adler found, furthermore, that the autospermotoxic serum, which he had produced in guinea-pigs, was active, also, against rabbits' spermatozoa; that the spermatozoa of the immunized animals are not sensitized; that the autospermotoxic sera are not hemolytic; and that the spermotoxins cannot be produced by the injection of other organs, such as liver or kidney.

The significance that was attached to these experiments with testicular substance in their relation to the problem of tumor immunity, was apparently taken from them by

- 1) Münch. med. Wochenschr., 1899.
- 2) Centralbl. f. Bakt., 1899.
- 3) Ann. de l'Inst. Pasteur.
- 4) Deutsche med. Wochenschr., 1900.
- 5) Ann. de l'Inst. Pasteur, 1900, No. 9.
- 6) Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 3, 1910.

the later investigations of v. Dungern and Hirschfeld, Dunbar, and Gräfenberg and Thies.

v. Dungern and Hirschfeld<sup>1)</sup> found that after an injection into rabbits of testicular substance a subsequent injection of the same material produced an exaggerated local reaction. This hypersensitiveness could be demonstrated usually after four days — once as early as the third day; it showed itself, upon the reinjection of rabbit's testicular substance or that of the ox, irrespective of whether the one or the other had been used for sensitizing; the reaction to subsequent injections of rabbit's testicle was greater in animals sensitized with ox testicle than in those sensitized with rabbit's testicle; and finally, the sensitization could be induced by injection of the animal's own testicle and the allergic reaction elicited by the subsequent injection of the same material, which had been kept frozen. These experiments show clearly that the testicle contains substances that are biochemically foreign to the rest of organism from which it was derived, and that some substances are possessed by the testicle of one species in common with that of other species. Schenk<sup>2)</sup>, in a relatively small series of experiments, was able to substantiate most of these observations.

Identical conclusions were reached in a larger study by Gräfenberg and Thies<sup>3)</sup>, whose experiments differed from those of v. Dungern and Hirschfeld in that the general anaphylactic reaction (intravenous injection) was used as the indicator instead of the local effect (subcutaneous injection).

The same results were obtained independently by Dunbar<sup>4)</sup>. Dunbar studied the pollen of various plants by means of the reaction of complement fixation and was able to demonstrate a complete absence of biochemical relationship between the pollen of a plant on the one hand, its leaves and root on the other hand. The various pollens were likewise shown to be unrelated among themselves.

---

1) Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Ref., Bd. 44, 1909, and Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 4, 1910.

2) Münch. med. Wochenschr., 1910, No. 17.

3) Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 4, 1910.

4) Ebenda.

Similar investigations were made also by Dunbar with the sexual cells, male and female, of a number of species of fish, which were taken from fresh and salt waters. Here also the sexual cells were found to be unrelated to the other tissues of the same individual from which they were derived, though they exhibited some degree of biochemical relationship to the sexual cells of distant species.

As we have observed, the significance that was attached to the immunization experiments with testicular substance in their relation to the problem of tumor immunity would seem to have been taken from them by the discovery that the testicle, by reason of its lack of biochemical relationship to the rest of the organism to which it belongs, occupies, apparently, a peculiar biological position among the body tissues. In other words the success of those immunization experiments does not necessarily justify any assumption regarding the outcome of similar attempts with the tissues of other organs or of tumors derived from them. But the well-known researches of Uhlenhuth<sup>1)</sup> and those of Krusius<sup>2)</sup>, the former upon lens-tissue, the latter upon the horny substances of the body surface, indicated the possibility, if not the probability, that all epithelial cells are, in part at least, biologically foreign to the rest of the organism. This question has been definitely settled by the recent publication of Halpern<sup>3)</sup>. Under the direction von Dungern, Halpern was able, by the use of the Bordet-Gengou reaction, the reaction of hem-agglutination and the anti-ferment reaction, to demonstrate antibody production in animals that had received injections of their own kidney, pancreas and spleen.

It will be convenient here to refer to the other investigations bearing upon the question of organ-spezifität. A large series of experiments by H. Pfeiffer<sup>4)</sup>, Pfeiffer and

---

1) Festschrift zum 60. Geburtstage R. Kochs, 1903.

2) Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 5, 1910.

3) Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 11, 1911, No. 5.

4) Wiener klin. Wochenschr., 1909, No. 1 und 36. — Sitzungsbericht d. k. Akad. d. Wiss., Bd. 118, 1909. — Vierteljahresschr. f. gerichtl. Medizin, 1909. — Supplem.-Bd. über d. Tagung d. Gesellsch. f. gerichtl. Med. in Salzburg.

Mita<sup>1)</sup>, and further confirmatory studies by Mita<sup>2)</sup> and others have been published to show that the second intraperitoneal injection of the antigen into guinea-pigs that have been rendered anaphylactic by the previous inoculation, causes a temperature drop, from the extent and duration of which can be calculated the degree of intensity of the anaphylactic shock. By the use of this method of studying the reactions of immunity Pfeiffer<sup>3)</sup> has been able to show a relative antigenic specificity of the different organ tissues of the same animal species.

The organ specificity demonstrated by Pfeiffer's experiments is, however, not necessarily an absolute one, since it is conceivable that all the different antigenic substances in each organ are present, in varying quantities, in all of the other organs, and that the apparent organ specificity shown by Pfeiffer's technique is merely due to a quantitative preponderance in the different organs of one or another antigenic cell component.

According to the experiments already cited, it is possible to produce a cytolytic immunity not only against the tissues of foreign species but also against the cells of animals of the same species, and furthermore, a similar immunity can be induced in an individual against certain of his own tissues.

#### **Tumor Immunity.**

The successful attempts to actively immunize animals against the inoculation of transplantable tumors also offer a rational basis for the application of the vaccine therapy to the treatment of human cancers.

Immunity of greater or less degree has been produced in the mouse, the rat, the dog and the rabbit against many different kinds of tumor.

It has been found that while the most marked degree of resistance to the development of transplanted tumor cells is

1) Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 4, 1910.

2) Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 5, 1910.

3) Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 8, 1911.

called forth by previous inoculation with the protoplasmic substances of the particular tumor under investigation, a good measure of resistance can be produced by the injection of normal tissues, adult or embryonal, provided they be of the same class as the tumor; i. e., epithelial or connective tissue as the case may be.

The studies upon the phenomenon of resistance to tumor implantations have classified this resistance as natural and acquired.

As to the nature of tumor immunity opinion is divided.

By some writers both the natural and acquired resistance to tumor inoculations are looked upon as the effect of an active immunization against the tissues of the tumor. The animals exhibiting a natural resistance, i. e., to the first inoculation, are thus assumed to react with sufficient vigor upon the first injection to cause the destruction of the tumor cells implanted at that time, even after they have begun to multiply. All species other than that to which the original tumor bearing individual belonged are naturally resistant and as a rule the transplantation of a tumor upon a race other than the one giving rise to the original growth but of the same species in quite unsuccessful. Finally, individuals of the same race as the original tumor bearer often resist primary inoculations.

In some individuals, however, the degree of immunity induced by the first introduction of the tumor substances is not great enough to prevent the development of a tumor. That a certain degree of resistance had existed could be demonstrated by excising the growth that developed from the primary inoculation and making a second injection, this time with negative result. Such a resistance to second injections is spoken of as acquired tumor immunity. To this category, also, is referred the resistance which results from the previous injection of non-cellular tumor extracts or of normal tissues.

As satisfactory as this explanation of tumor immunity seems to be, it cannot be denied that certain difficulties attach to it.

One of these has been that even in highly resistant individuals antibodies against the tumor substance demonstrable with the precipitin or complement fixation tests have not been

found. Ascoli and Izar<sup>1)</sup>, it is true, employing a technique of their own elaboration, the so-called meiotagmin reaction have discovered, in a certain proportion of cases, a qualitative difference between the sera of tumor animals and of normal animals. Whether this difference is due to the presence, in the sera of the tumor animals, of true antibodies has not been shown.

The absence of demonstrable antibodies in animals that are immune to transplantable tumors offered support for the belief that their immunity is not due to cytolytic antibodies, but to some other, perhaps hitherto unknown, immunization process.

v. Dungern has expressed the opinion that the destruction of the tumor cells, at the second or succeeding inoculations of his sarcoma of the wild hare was accomplished by non-specific substances such as are produced in a hypersensitive animal upon the introduction of the corresponding antigen. This opinion, which was based upon the observation of an increased (allergic) local reaction upon the second injection of the tumor substances, was supported by a series of experiments in which a destruction of rabbit's blood corpuscles was shown when these were introduced with the tumor tissue at the second inoculation into rabbits. On the basis of these observations v. Dungern has outlined the anaphylactic theory of tumor immunity in general.

What seems to be the first experimental evidence in support of the theory in its general application has been presented in the study from this laboratory by R. Weil<sup>2)</sup> on „The nature of tumor immunity in rats“; Weil, using the Flexner-Jobling adeno-carcinoma of the rat, found:

1. That previous injection of filtered tumor juice immunizes rats to subsequent inoculations.

2. Immunity may be established by injecting the juice immediately before inoculating the tumor, and it persists for 4—5 weeks.

3. Inoculations into immunized animals result regularly

---

1) Münch. med. Wochenschr., 1910, No. 8.

2) Proceedings of the Society for experimental Biology and Medicine, New York, Vol. 9, 1911, p. 32.



in a greatly increased local inflammatory reaction. This allergic reaction was elicited if the inoculation was made immediately after the immunizing injection, or within 4 or 5 weeks following it, and was also exhibited upon the inoculation of animals bearing necrotic tumors, such animals being likewise immune.

In his preliminary communication Weil called attention to the possibility that the allergic condition is not developed by the introduction of the tumor substances themselves, but is due to some concomitant infective agent. In view of this uncertainty, the interpretation of his results must still be held in suspense. A series of experiments by Yamanouchi<sup>1)</sup> seemed to offer further support to v. Dungern's hypothesis. Yamanouchi reported that peritoneal injections of tumor emulsion in mice bearing tumors of the same strain, were highly toxic, whereas, similar injections into normal mice, or mice bearing tumors of a different strain, were innocuous. But Apolant<sup>2)</sup> immediately repeated these experiments and failed entirely to confirm Yamanouchi's results.

However, Apolant's failure to demonstrate a condition of hypersensitiveness in tumor mice cannot, by any means, be regarded as a contradiction of v. Dungern's assumption, for, as has been shown by H. Ritz<sup>3)</sup>, the general anaphylactic reaction can be produced in mice only by intravenous injections. If the theory of tumor immunity advanced by v. Dungern should be generally confirmed, the failure to demonstrate specific antibodies in immune animals by means of the precipitin test and the usual reaction of complement fixation will be immediately explained; for, as was first shown by Sleeswijk<sup>4)</sup>, these reactions are not available for the demonstration of anaphylactic antibodies.

Ehrlich<sup>5)</sup>, while recognizing an actively acquired form of immunity, as demonstrated in the resistance induced by treatment with normal organs and embryonic tissues, advanced as the most potent objection to the theory of tumor immunity by

1) *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 1909, No. 16.

2) *Zeitschr. f. Immunitätsf.*, Bd. 3, 1909, No. 1.

3) *Ibid.*, Bd. 9, 1911, No. 3.

4) *Ibid.*, Bd. 2, 1909, No. 2.

5) *Verhandlungen der Deutschen Pathologischen Gesellschaft*, 1908.

antibody production, the fact that up to the time of his writing passive immunization against tumor inoculations with the blood of immune animals had not been convincingly demonstrated. The subsequent experiments of v. Dungern<sup>1)</sup>, seem successfully to meet this objection without, however, showing the nature of the antibodies concerned, for example, whether they are anaphylactic or cytolytic.

A further objection, previously expressed by Ehrlich<sup>2)</sup>, was based upon his observation that a mouse tumor transplanted upon the rat and excised before retrograde processes had begun (8<sup>th</sup> to 10<sup>th</sup> day) could be successfully returned to mice, but would not grow at all in rats except after an intervening passage through the mouse. This fact, Ehrlich said, could not be explained under the known forms of immunity and on the basis of that discrepancy he elaborated his well-known theory of athreptic<sup>3)</sup> tumor immunity.

v. Dungern and Werner<sup>4)</sup> attempted to harmonize Ehrlich's observation with the facts of cytolytic immunity by assuming that by the eighth to the tenth day of their sojourn in the alien host, the mouse tumor cells had absorbed the antibodies, which were supposed to have been produced after the usual incubation period, in quantity sufficient to render the cells vulnerable to the relatively large amount of rat complement with which they are brought into immediate relationship upon further transplantation upon rats; the absorption of the antibodies, however, had not sensitized the cells to the influence of mouse blood.

This view is supported by a number of considerations.

The first consideration has to do with the nature of the active immunity in foreign species, which was first demon-

1) Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 5, 1910.

2) Arbeiten aus dem Königl. Institut für experimentelle Therapie, Frankfurt 1906—1908, also Zeitschr. f. ärztl. Fortb., Bd. 3, 1906.

3) Two ways of spelling this word are met with in the literature on the subject; i. e., with and without the use of the letter "h". The word is derived from the Greek *τρέφω* whose root according to rule is found in the aorist which is *ἔθρεψα*. For this reason the letter "h" should be retained as it was by Ehrlich, who invented the word.

4) v. Dungern and Werner, *Das Wesen der bösartigen Geschwülste*, p. 118.

strated by Ehrlich<sup>1)</sup> and referred by him to the formation of specific antibodies. Although, as has already been stated, the reactions of specific precipitation and complement fixation have failed to demonstrate antibodies in animals that are actively immune to tumor inoculation, yet the experiments of Lambert and Hanes<sup>2)</sup> on the cultivation of tumor cells in blood plasma lend considerable strength to the assumption of a cytotoxic antibody immunity in immunized animals of foreign species.

These writers have shown that whereas the cells of the mouse sarcoma used in their studies can be cultivated in the normal plasma of rats and guinea pigs, the same cells will not grow at all, or very feebly in the plasma of individuals of these foreign species that have previously received injections of the mouse sarcoma. These investigations demonstrate, therefore, a cytotoxic power on the part of the plasma of actively immunized animals of foreign species. Such a cytotoxic power had previously been found by the same authors, to be entirely wanting in the plasma of immunized animals of the same species<sup>3)</sup>; i. e. rat sarcoma cells could be readily cultivated in the plasma of rats immunized against rat sarcoma.

In accordance with these facts, then, it is conceivable, from the standpoint of the antibody theory of tumor immunity, that the destruction of tumor cells in the immunized animal of foreign species is due to a direct cytotoxic action by the immune substances with the aid of complement, whereas, in immune animals of the same species the cell destruction is brought about indirectly; i. e. through the injurious influence of the products of a local anaphylactic reaction (v. Dungern-Weil).

It is known, in the first place, that the mere absorption of specific cytolytic antibodies by living cells does not interfere with the subsequent growth and multiplication of those cells;

1) Loc. cit.

2) Journ. Exper. Med., Vol. 14, 1911, No. 5, p. 453.

3) Journ. Exper. Med., Vol. 13, 1911, p. 505.

furthermore, it is a well established fact that the cells of one animal that have been sensitized with the cytolytic antibodies produced against them in another animal are much less susceptible to the complementary activity of the serum of the animal from which they originate than to that of the immunized animal. Applying these facts to the interpretation of Ehrlich's "zig-zag" experiment it could be assumed that eight days after inoculation into the rat, the mouse tumor cells have absorbed sufficient specifically produced antibodies to render them vulnerable to the relatively large amount of rat complement with which they are brought into immediate relationship upon further transplantation upon rats, but are not injured by mouse blood when they are introduced into the latter animal.

However, the foregoing explanation has been rendered nearly superfluous by the observation of Ritz<sup>1)</sup>, that whereas rat's blood possesses considerable complementary power, this function is only partially represented in mouse's blood. Ritz found, namely, that only the "mid-piece" of complement can be demonstrated in mouse's blood, not the "end-piece".

The crux of the argument relating to v. Dungern and Werner's explanation of Ehrlich's zig-zag experiment lies in the question whether the mouse tumor cells could have absorbed a quantity of antibody from the circulation of the first rat sufficient to sensitize them before enough rat complement could have been taken up to cause their entire destruction. Ehrlich answers this question with an emphatic negative.

In this connection, we would call attention to the well-known fact that the antibody content of immune blood is usually much greater than its complement content. The proportional content of these two elements is often as wide as 50 to 1. Since the blood, excepting in hemorrhage, does not have direct access to the growing tumor cells, it would seem permissible to assume with v. Dungern and Werner that

---

1) Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 9, 1911, No. 3.

neither the antibodies nor complement which are present in the blood stream are immediately available for absorption by the tumor cells but require a certain amount of time to pass through the capillary walls; so that even if the proportions of these two elements are preserved in the transudate, the sensitization of the tumor cells may conceivably be complete before a lethal amount of complement has been absorbed.

The study of Lambert and Hanes<sup>1)</sup> upon "The Cultivation of tissue in plasma from alien species", furnished important information bearing upon the question of "athrepsie" in natural tumor immunity. The results obtained by these authors show first, that tumor cells may continue to grow in the normal plasma of foreign species for as long as thirty days; that is, long after the same cells would have been destroyed if they had been inoculated into an animal of the species from which the plasma was obtained. Second, that the viability of the tumor cells in plasma culture depends upon the species from which the plasma was derived. We are unable to harmonize the athreptic theory with these facts. The fact that tumor cells can be cultivated in a heterologous plasma beyond the time at which, in the corresponding inoculation experiment, they would have succumbed, points to a change in the blood of the inoculated animal after a definite latent period, which change does not take place in the plasma *in vitro*. The observation seems to be quite incompatible with the conception that the natural resistance to tumor implantations in foreign species is due to a failure on the part of the foreign organism to supply an indispensable specific food stuff. Furthermore, the demonstration by Lambert and Hanes<sup>1)</sup> of a close parallelism between the hemolytic action of the alien sera and their inhibitory influence upon the growth of the tumor cells makes it probable that the natural immunity, in some animals, to implantations of the tumor which they were using, is due to a destructive action on the part of the foreign blood rather than to any athreptic influence.

---

1) Journal of Exp. Med., Vol. 14, 1911, No. 2.

Ehrlich invokes the theory of "athrepsie" for the explanation not only of natural tumor immunity but also of the intraracial resistance to inoculation seen in some animals that already bear rapidly growing tumors<sup>1</sup>), and of his own observation<sup>2</sup>) that the percentage of metastases from slowly growing tumors is relatively much greater than it is from rapidly growing ones. Furthermore, Apolant<sup>3</sup>), in Ehrlich's institute, has seen the influence of "athrepsie" in the increased rapidity of growth that is so often observed in the recurrent growths after operation and in the frequent failure of metastatic deposits to develop until after the larger tumor mass is removed by operation.

The athrepsie which is thought to be operative under these conditions is brought about by circumstances that are entirely different from those which cause the athrepsie assumed for the natural resistance to tumor implantations into foreign species. The determining causative factor underlying the phenomena just described is held to be not the absence of a specific food stuff, but an unequal "avidity" of the "nutri-receptors" of the different tumor cells, as a result of which, the tumor cells bearing "receptors" of greater avidity deprive the other cells i. e., the cells of the metastatic deposits and those of the second inoculation of nourishment sufficient to maintain growth.

We are unable to see why the resistance to the inoculations made in tumor-bearing animals cannot be referred to an active immunity, the existence of which, by the way, must be admitted in many of the animals of the double-inoculation series of Apolant<sup>4</sup>).

As paradoxical as it may seem, the fact, nevertheless, remains established by the clear experiments of v. Dungern<sup>5</sup>) that an absolutely protective active immunity to the implant-

---

1) Verhandlungen d. Deutschen Path. Gesellsch., 1908.

2) Verhandlungen d. Deutschen Path. Gesellsch., 1899, p. 18.

3) Zeitschr. f. Immunitätsforsch., Bd. 10, 1911, No. 1 and 2.

4) Zeitschr. f. Immunitätsforsch., Bd. 10, 1911, p. 103.

5) Zeitschr. f. Immunitätsforsch., Bd. 2.

ation of a highly virulent sarcoma may exist in the presence of a vigorously growing tumor of the same strain. This was readily demonstrated by completely excising the tumor resulting from the first inoculation at the height of its development. The subsequent inoculation was fruitless. Apolant<sup>1)</sup> wishes to exclude from the discussion of tumor immunity all the evidence obtained from v. Dungern's studies upon the wild hare sarcoma. His objections seem to imply that this sarcoma is infectious in nature although v. Dungern, by a brilliantly conceived method, proved beyond question the true tumor nature of the transplanted growths.

Ehrlich's observations regarding the percentage of metastases from slowly growing and from rapidly growing tumors were not confirmed by Bashford, Murray and Haaland<sup>2)</sup>, who met with a reversed relationship.

The evidence offered by the increased rapidity of growth in the recurrences after operation is far from being such a convincing example of an athreptic influence as Apolant contends. We have only to recall the many instances of greatly increased rapidity of growth following trauma without operation, and the fact that the increased rate of growth remains in the recurrence even after it has passed the size of the original tumor, in order to recognize the inapplicability of the athreptic theory to this phenomenon.

There remains, after all, but one phenomenon of tumor development that apparently, is quite refractory to any application of the principles of antibody immunity. That phenomenon is the common observation that the metastatic growths develop more frequently after operation than before, and it is seen both in human tumors and in the transplantable tumors<sup>3)</sup> of lower animals. While the theory of athreptic immunity seems to offer here a most plausible explanation, another possibility must not be forgotten; namely, that at the

1) l. c.

2) 3rd Scientific Report Imperial Cancer Research Fund, 1908, p. 386.

3) Clunet, *Recherches expérimentales sur les tumeurs malignes*, Paris 1910.

time of the operation there could have been a mechanical distribution of tumor cells from the original tumor, or that tumor cells, that had already found their way to neighboring lymph-glands might be stimulated to growth by the inflammatory processes, which accompany the healing of the surgical wound.

The doctrine of "food receptors of unequal avidity", was promulgated independantly by Ehrlich<sup>1)</sup> and Albrecht<sup>2)</sup> as an explanation of the nature of malignant growth and was used by Ehrlich to explain why most spontaneous tumors are not transplantable into other individuals of the same race.

In this capacity also, the athreptic theory is in disagreement with experimental facts. The extensive experiments of Murray<sup>3)</sup> and Haaland<sup>4)</sup> with spontaneous mouse tumors render the hypothesis of Ehrlich and Albrecht quite untenable<sup>5)</sup>.

As we have already remarked, the results of the experiments dealing with the question of immunity to transplanted tumors seem to point the way to the application of a rational vaccination therapy in human cancer. It must be conceded, however, that the conditions under which the transplanted tumors are studied may be entirely different from those surrounding the development of the spontaneous tumors, which, as the London investigators have shown, so closely resemble the corresponding human cancers. This consideration applies not only to tumors transplanted upon foreign races or species, but to those transferred to other individuals of the same race. The studies of Landsteiner<sup>6)</sup> and v. Dungen<sup>7)</sup> reveal unexpected differences in the biochemical structure of the blood from different individuals of the same

---

1) Arbeiten aus d. Kgl. Inst. f. exp. Therapie, Frankfurt 1906—1908.

2) Verh. der Path. Gesellsch. zu Meran, 1906.

3) 3rd Scientific Report of the Imperial Cancer Research Fund, p. 69.

4) 4th Scientific Report of the Imperial Cancer Research Fund, p. 62.

5) See also Bashford, *ibid.* p. 187.

6) Wien. klin. Wochenschr., 1901.

7) Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 4, 6 and 8, 1910.



race, in the light of which the results of immunization experiments obtained with transplanted tumors must be seriously discounted.

The observations of Bashford<sup>1)</sup> and his co-workers, upon tumor immunity in relation to the spontaneous tumors seem actually to set at naught all that has been learned in the study of resistance to transplanted tumors. It was found, first, that animals bearing spontaneous tumors were not resistant to the inoculation of transplantable tumors, and secondly, that a spontaneous tumor may develop in an animal that has been repeatedly shown to be immune to inoculable tumors both before and after the appearance of the spontaneous growth. The latter observation has been confirmed by Thorel<sup>2)</sup>. The same important objection must be urged against those reported experiments in lower animals whose purpose has been the cure of transplanted tumors, and whose results, but for that objection, would seem directly to favor the application of vaccination therapy to the human disease. We refer to the experiments of Clowes<sup>3)</sup>, Clowes and Baeslack<sup>4)</sup>, v. Dungern<sup>5)</sup>, Gay<sup>6)</sup> and Blumenthal<sup>7)</sup>.

The preceding review of the experimental studies concerning normal tissue and tumor immunity may be more briefly summarized as follows:

I. Antibody production has been demonstrated:

- a) Against various tissue cells of foreign species.
- b) Against certain of the individuals own tissue cells.
  - 1) By injection of tissues of other individuals of the same species.
  - 2) By injection of tissues of the same individual.

1) 3rd Scientific Report, Imp. Cancer Research Fund, 1908.

2) Centralbl. f. allgem. Path., 1908, No. 10; Verh. d. Deutschen Path. Ges. zu Kiel, April 1908.

3) Johns Hopkins Hosp. Bull., April 1905.

4) Medical News, Nov. 18, 1908.

5) Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 2, 1909.

6) Journ. of Med. Research., Vol. 20, 1909.

7) Med. Klinik, 1910, No. 50. Revue gén. des Sc., 1907, p. 1004.

- II. A distinct biochemical relationship has been shown to exist between the homologous tissues of different species of animal, while on the other hand a relative organ specificity has been found in the various tissues of the same species.
- III. Resistance to tumor inoculations is natural and acquired. As to the nature of this resistance there are two general hypotheses:
- a) that both forms are active and dependent upon the development of specific antibodies. The usual biological tests of complement deviation and specific precipitation fail to show the hypothetical antibodies, though a distinct cytotoxic influence can be demonstrated in the plasma of animals of foreign species that have been actively immunized against a tumor. The mechanism of the antibody immunity has been conceived as directly cytotoxic through the cooperation of complement, or indirectly destructive through the influence of the local allergetic reaction.
  - b) that the natural resistance is due to the failure of the inoculated animal to supply to the transplanted tumor cells a hypothetical specific foodstuff without which the tumor cells cannot grow. This explanation of tumor immunity, which is known as the "athreptic" theory, has been applied, also, in different form, to certain manifestations of the acquired resistance to tumor implantations. The available evidence upon the nature of tumor immunity offers no proof of the existence of an athreptic influence as a determining factor. The theory is incompatible with certain observations and at best has but a limited applicability.
- IV. An animal immunized to one tumor may also have acquired an immunity to other tumors (pan-immunity) but an animal that has developed a spontaneous tumor may not be immune to a transplantable tumor, and vice versa, an animal thoroughly immunized to a

transplanted tumor, may subsequently develop a spontaneous tumor.

- V. The "cure" of a growing transplanted tumor has apparently been effected by the further injection of the tumor tissue.

It is a pleasure to acknowledge the valuable assistance of Dr. Richard Weil which has been freely given to the writer during the preparation of this paper.

### Zusammenfassung.

Die Ergebnisse der experimentellen Studien über die Immunität gegen normales und bösartig wachsendes Gewebe können wie folgt kurz zusammengefaßt werden.

I. Die Bildung cytolytischer Antikörper ist demonstriert worden :

- a) gegen verschiedene Gewebszellen fremder Arten ;
- b) gegen gewisse Gewebszellen des eigenen Körpers,
  - 1. durch Injektion von Geweben anderer Individuen derselben Tierart ;
  - 2. durch Injektion von Geweben desselben Individuums.

II. Gezeigt worden ist einerseits eine ausgesprochene biochemische Verwandtschaft unter den homologen Geweben verschiedener Tierarten, und andererseits eine relative Organspezifität unter den verschiedenen Geweben derselben Art.

III. Die Resistenz gegenüber Tumorübertragungen ist natürlich oder erworben.

Zur Erklärung der Natur dieser Resistenz sind zwei Hypothesen aufgestellt worden.

a) Nach der ersten Hypothese sind beide Formen der Immunität aktiv und beruhen auf der Bildung spezifischer Antikörper. Es ist nicht gelungen, mittels der Methoden der Komplementablenkung und der spezifischer Präzipitation die angenommenen Antikörper nachzuweisen. Es ist aber eine cytotoxische Wirkung des Plasmas immunisierter Tiere fremder Art gezeigt worden, die dem Plasma unbehandelter Tiere fehlt.

Der Mechanismus der Antikörperimmunität gegen Tumoren könnte als eine direkte cytotoxische Wirkung (Ambozeptor-Komplement) aufgefaßt werden, oder aber als ein indirekter Effekt einer lokalen, allergetischen Reaktion.

b) Der zweiten Auffassung nach wird die natürliche Resistenz durch das Fehlen eines hypothetischen unentbehrlichen Nährstoffes in dem eingespritzten Tier zustande gebracht.

Diese Erklärung der Geschwulstimmunität, die als die „athreptische“ Theorie bezeichnet wird, ist in etwas anderer Form auch zur Erklärung gewisser Manifestationen der erworbenen Resistenz gegen Tumorimpfungen angewandt worden.

Unsere heutige Kenntnis über das Wesen der Geschwulstimmunität bietet bis jetzt keinen Beweis von der Existenz eines athreptischen Einflusses als ein entscheidender Faktor. Die Theorie läßt sich mit gewissen Beobachtungen nicht vereinigen und hat im besten Falle nur eine beschränkte Anwendung.

IV. Ein Tier, das gegen einen transplantablen Tumor immunisiert worden ist, kann auch gegen andere transplantable Tumoren immun geworden sein (Panimmunität); ein Tier, das einen Spontantumor trägt, kann gegen einen verimpfbaren Tumor empfänglich sein und auf einem Tier, das gegen einen verimpfbaren Tumor sicher immun ist, kann sich ein Spontantumor entwickeln.

V. Die weitere Injektion eines verimpfbaren Tumors scheint die Heilung eines schon bestehenden Tumors zur Folge gehabt zu haben.

*Nachdruck verboten.*

[From the Research Laboratory of the H. K. Mulford Company<sup>1)</sup> in Philadelphia, Pa. and the Research Laboratory of the Department of Sanitation of Cuba, in Havana.]

### **"Vaccination" in Cancer.**

#### **II.**

#### **A Report of the results of the vaccination therapy as applied in 79 cases of Human Cancer.**

By

**Arthur F. Coca,**  
Department of Experimental Pathology Cornell University Medical College New York.

**G. M. Dorrance,**  
Surgeon to St. Agnes Hospital, Philadelphia, Pa.

**M. G. Lebredo,**  
Director of the Research Laboratory of the Department of Sanitation of Cuba.

(Eingegangen bei der Redaktion am 24. März 1912.)

The experimental data bearing upon the question of tumor immunity offer little encouragement to the advocate of vaccination in the treatment of cancer. On the other hand, the reported results of such treatment in human beings, which were available at the time we began the present investigation seemed to indicate that further attempts at active immunization were justified in the human disease.

Of those who had put the principles of vaccination into practice in malignant disease Le Bertrand<sup>2)</sup> and Coca and Gilman<sup>3)</sup> had reported apparently successful results<sup>4)</sup>.

1) We take pleasure in acknowledging our obligation to the gentlemen of the H. K. Mulford Co., for their generous support of this investigation. The entire expense involved by the experiments, including the equipment of a special laboratory, was borne by this firm. Our thanks are due, also, to the members of the scientific staff of the company for many helpful suggestions and other kindnesses.

2) *Annal. de la Soc. de Méd. d'Anvers*, Oct.-Nov.-Dec. 1909.

3) *Philippine Journ. of Sc., Med. Sect.*, Dec. 1909.

4) von Leyden and Blumenthal (*Deutsche med. Wochenschr.*, Bd. 28, 1902) believed that in three cases, as a result of a similar treatment,

Le Bertrand described one case apparently cured, after a long course of alternate injections of small quantities of an emulsion of carcinoma cells and of a glycolytic ferment. These injections were made at intervals of four days. During the first six weeks of the injections the tumor increased steadily in size and the treatment was then discontinued. After an interval of two months the injections were resumed and during the succeeding course of the treatment, which suffered an interruption of one month, a large cauliflower-like mass and numerous other nodules of lesser size disappeared. The patient was exhibited before the International Congress at Paris in September 1910 still apparently free from the disease.

Coca and Gilman studied the effect of injections of large quantities (3—15 grams) of emulsified tumor tissue, repeating the injections at intervals of about two weeks. Of the fourteen cases forming the basis of their preliminary report, two may be considered as being of special significance.

The history in full of these cases is as follows:

Valentin Noguera, Iloilo, Panay, 13 Calle Rosario, age 40 years, married? Hospital Number: 8442<sup>1</sup>).

Clinical Diagnosis: December 7, 1909, — Carcinoma of the neck arising from the Branchial Arch.

Present illness: Began 8 months ago with slight difficulty in swallowing solid food, followed by general pain in a couple of months, that radiated over the tongue and the back of the mouth. At this time (six months before admission) the patient noticed a small hard mass about 1.5 cm. in size in the upper, outer part of the right side of the neck. This was painless when first noted and was not very freely moveable. It increased quite rapidly in size until swallowing became very difficult, the mass measuring about 5 cm. in diameter. An operation for its removal was then performed by Dr. Gonzales of Iloilo. The growth recurred immediately and during the past two months the tumor has grown still more rapidly, so that the patient has now great difficulty in swallowing even liquids. He has lost greatly in weight.

metastases were prevented, and affected lymph glands were reduced in size. Still more recently Rovsing (2nd International Conference for the study of Cancer, Paris 1910) has reported remarkable improvement — disappearance of tumor nodules, and of cachectic symptoms — in a few cases of sarcoma under similar treatment.

1) For the clinical history, notes of the operation etc. of these cases we are indebted to Dr. P. K. Gilman.

**Physical Examination:** The patient is emaciated. There is an ovoid tumor mass projecting below the angle of the jaw on the right side. This prominent mass measures  $7 \times 4$  cm., is of a uniformly dense consistence, and is attached, though not firmly, to the overlying skin. It is absolutely immovable, being bound firmly to the deep structures of the neck and ramus of the jaw. One extension of the tumor in the submaxillary region forms another less prominent nodule 3 cm. in diameter which projects somewhat above the level of the jaw and cheek. Enlarged glands cannot be made out as the entire side of the upper neck is indurated.

Operation December 7, 1909, by Dr. P. K. Gilman. Ether. Removal of the greater portion of the tumor. Two weeks have elapsed since admission, during which time forced milk diet and tonics have built up the patient's strength a little. A hurried operation is demanded as the patient's condition is not good.

The jugular vein is tied and excised, and the carotid artery clamped with Crile's clamp. The sterno-mastoid muscle is dissected up with the tumor from below as cleanly as possible. The lower portion of the parotid is removed and a portion of the submaxillary gland. The tumor is intimately adherent to the wall of the carotid and can not be dissected free as it surrounds the bifurcation completely. As little as possible is left adhering to carotid bifurcation. The facial nerve is seen and cut as it is buried in the tumor. The 10th nerve is also surrounded, but with considerable difficulty is dissected free, the tumor having invaded only the nerve sheath. A portion of the tumor extending upward over the submaxillary gland behind the jaw is cut across and a mass measuring about  $3 \times 2.5$  cm. across the base extending up behind the jaw is left unexcised, as it is impossible to perform a more complete operation without endangering the life of the patient. Another mass is left at the angle of the jaw, this mass being somewhat smaller than the one in the submaxillary region.

Immediately after the operation, 20 grams of the tumor material are ground up with 20 c. c. of sterile physiological salt solution and centrifugalized. To the decanted supernatant fluid is added 5% carbolic acid to a concentration of  $\frac{1}{2}$ %. Two hours after the addition of the antiseptic one half of the decanted fluid is injected in two portions subcutaneously over the abdomen.

December 8, 1909. There is some increase in the local temperature over both injected areas and the overlying skin is somewhat reddened. No induration is present.

December 27th, 1909, the unexcised tumor masses have apparently diminished greatly in size. No infection has followed the injections.

January 8, 1910: The anterior nodule in the region of the submaxillary gland appears to have begun to grow again and is practically level with the ramus of the jaw. There is also a hard thickened ridge extending vertically along the anterior border of the sterno-cleido-mastoid muscle about

10 cm. in length. The skin over this mass is firmly adherent to the tumor.

On January 2nd a large tumor, probably derived from the epithelial vestiges of the branchial arch was removed from the neck of a Filipino 50 yrs. of age. The man died during the night following the operation. The tumor was sent at once to the cold storage plant, where it was kept frozen. On January 6th, 60 grams of this tumor tissue were ground up without the addition of salt solution, being passed only twice through the vaccine grinder. After centrifugalization 25 c.c. were decanted, to which 2.7 c.c. 5% carbolic acid were added, that is, in a final concentration of  $\frac{1}{8}$ %. The fluid was kept in the ice box at 7° C. until January 8th, when 10 c.c. were injected in three portions subcutaneously over the abdomen in the present case.

January 10, 1910: The anterior tumor nodule measures  $4 \times 3.5$  cm. is hard and immovable.

January 17, 1910: The patient feels sick today and complains that the injected areas have been very painful for two days. The anterior tumor mass is softer and definitely smaller.

January 20, 1910: The tumor mass in the submaxillary region today has nearly disappeared, measuring at most, by making very free allowance 2 cm. in its largest diameter. It is soft and fairly moveable. The patient feels well today and there is no pain in any of the injection spots. Appetite is good; he is gaining in weight.

January 22, 1910: The 2 cm. mass has practically disappeared. Since the last examination the hard, thick, vertical ridge referred to in the note of Jan. 8th has almost disappeared, leaving only a mass  $3 \times 2.5$  cm. at the upper insertion of the sterno-cleido-mastoid muscle. In the neck below this vestige no evidence of the former almost cartilaginous mass remains.

January 24, 1910: The area in the submaxillary region is about the same as at the last examination; the mass along the sterno-mastoid measures  $2.5 \times 2.2$  cm. The neck is otherwise normally soft.

January 29, 1910: Operation: The indurated areas were exposed and practically nothing but scar tissue was found with a few "nests" of cellular tissue. The patient took ether badly and collapsed during the short operation.

February 1, 1910: The patient is not in good condition and the heart has not recovered from its sudden break during the operation. Considerable cyanosis of the lips and finger tips is present and the patient is very weak. The neck is healing well.

February 2, 1910: The patient died suddenly during the night.

Microscopical examination of sections made from the scar tissue, which was removed at the last operation, revealed



a coarse reticulum of fibrous tissue, in the meshes of which were found nests of large epithelial-like cells in all stages of degeneration and necrosis, together with lymphoid cells and macrophages.

José Composano, Widower, age 51 yrs. Navatas, Rizal Province; boatman; admitted April 26th, 1909. Hospital Number 7052.

Clinical Diagnosis: Carcinoma of the right buccal mucosa with involvement of the lips, the sublingual and submaxillary glands and the lymphatic glands of right neck.

Complaint: Pain in the right cheek.

Personal History: Smallpox with abscesses; hematuria; "beri-beri"; dysentery; hydrocele; gonorrhea.

Present Illness: The present trouble is a recurrent growth, the patient having been operated upon for the primary growth one month ago in this hospital. No vaccine was given after this first operation. One week ago the patient began to feel shooting pains in the scar of the previous operation, which pain has become continuous. With his tongue the patient can feel a hard mass inside the right cheek.

Physical Examination: The general condition and appetite are good and bowels are regular; there is a slight cough. The cicatrix on the right cheek, extending from the angle of the mouth nearly to the ramus of the jaw is markedly thickened and indurated with an irregular, firm growth, which is broken down and ulcerated at one point near the mouth angle. The base of the ulcer is deep and appears punched out; the edges are rounded and hard; the ulcer is about 4 mm. in diameter. A second linear cicatrix running at right angles to the first and extending downward over the neck, marks the field where the glands on the right side of the neck were removed on May 1st, 1909.

Second Operation, June 14, 1909: At the second operation only a portion of the growth was removed to be used in making a vaccine, as so much tissue had been sacrificed at the previous one, that a plastic operation the second time was impossible.

June 16, 1909: The tumor tissue, which had been kept in the ice-box at 7° C, is dissected away from the surrounding skin, mucous membrane and fat, and incised. By the incision a small cavity is opened which contains a cheesy, yellow material. The contents are scraped out and the cavity washed with sterile salt solution.

The entire quantity of malignant tissue weighing 10 grams is ground up with 3 c. c. of glycerin and 20 c. c. of sterile salt solution. The resulting thick emulsion is centrifugalized for one hour and 15 c. c. of the supernatant fluid are decanted. Carbolic acid is added to the decanted fluid in  $\frac{1}{2}$  % concentration and two hours later 7 c. c. are injected subcutaneously in one portion in the back. The remaining portion is kept in the ice-box at 7° C to be used for the second treatment.

June 17, 1909. There is a slight induration about the area of injection in the back and the area is exquisitely tender. The patient is up and walking about. The temperature before the injection was about 37.8 degrees C. To day it has risen to 38.8 degrees.

June 18: The back is still very tender and reddened superficially for some distance about the site of injection. (Probably infection.) Temperature 38.8° C.

June 21st: The injection spot is very slightly tender. The area measures about 8:5 cm. and is little if at all elevated. There is no enlargement of the glands in the left axilla. The temperature is normal.

June 24th: The face is healing well and the wound is not painful. The skin edges are clean. The indurated area in the back is smaller, measuring about 4 cm. in diameter; it is firm, freely moveable over the thorax, and very slightly painful on firm pressure. The left axillary glands are somewhat more readily palpable than the right.

June 30th: The temperature remains normal. The patient is given a second injection of the remaining half of the tumor preparation (7.0 c.c.) into the back on the right side over 10th rib, 10 cm. from the midline.

July 1st: There has been no rise in temperature. The injected area in the right back is painful to touch. The skin is not reddened over it and there is no induration at present.

July 3rd: The wound in the face is entirely healed with the exception of a small opening back of the new angle of the mouth which connects with the buccal cavity. The cheek is not indurated except along the scar; there is no sign of recurrence. The first injection spot is still somewhat indurated though much smaller and not painful. The second injection spot is not tender and is much less indurated than the first was. The glands in the left axilla are still enlarged; those in the right axilla are apparently unaffected.

July 7th: The wound in the face is healing well and the opening in the cheek is granulating cleanly.

August 18th: The patient is discharged: the face is entirely healed and there are no signs of recurrence. He promises to return if the face becomes "sore" again.

March 3, 1910: Since leaving the hospital the patient has failed to report regarding his condition. He was visited at his home today. He appears to be perfectly well and there is no sign of recurrence. The cheek is soft and flexible and is not thickened. On the lower lip opposite the involved cheek is a small ulceration which, however, shows no evidence of malignancy.

June 1, 1910: Inquiry after the patient elicited the fact that he is apparently well and is visiting friends in the provinces.

Histological examination of the tumor showed it to be a typical carcinoma. Pearly bodies were absent.

### Technique.

Since our purpose was to introduce a large quantity of the tumor substances in, as nearly as possible, an unaltered condition we have followed the procedure of Coca and Gilman, sometimes, however, injecting the entire material (after passing it through a Baird and Tatlock Vaccine machine) without centrifugation. The machine and all glassware were sterilized in the autoclave; the dissecting instruments were boiled in a 1 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  solution; the table on which the tissue was ground was first flooded with 5 % carbolic acid and then covered with wet sterile sheets; the operators wore sterile gowns and gloves. One or two hours before the preparation of the vaccine was begun the floor and woodwork of the room were flooded with water and kept continually wet during the operation. By this means the number of the air bacteria was reduced by about 90 %.

Under these conditions, vaccine that had been made from a sterile tumor without the addition of any antiseptic remained sterile after ten days. Following the recommendation of Coca and Gilman,  $\frac{1}{2}$  % of carbolic acid was added to the preparations that were made from surface growths. Over sixty injections were made in Manila of vaccine derived from various sources, always with the addition of  $\frac{1}{2}$  % carbolic acid, and although bacteria were practically always present in the material used, the few infections that resulted were always localized to the injections sites and general septic symptoms were rare and very mild. This freedom from severe infection was ascribed to the influence of the antiseptic, which, while not sufficient to sterilize<sup>1)</sup>, was still thought to be capable of reducing the vitality and virulence of the microorganisms present.

The fallacy of this assumption was soon apparent in the earlier Philadelphia cases, for in a number of instances severe

1) While  $\frac{1}{2}$  % Carbolic acid will quickly sterilize a bouillon culture of bacteria, this concentration of the antiseptic is too weak to kill the same microorganisms in the highly proteid emulsion represented by the tumor vaccine.

streptococcic infection followed the injection of tumor pulp that had been in contact, for at least twenty-four hours, with  $\frac{1}{2}$  % Carbolic acid.

The only apparent alternative conclusion was that streptococcus pyogenes occurs with relative infrequency in Manila, and if this was true of Manila it was probably true also of the tropics generally.

Inquiry regarding this question was made both in Manila and in Havana, and it was found that in the former place and even in the much more temperate climate of the latter city this infection is relatively rare and mild in form.

Musgrave has recently stated that during his long, active private and hospital practice in the Philippines he had never seen a case of streptococcic infection.

Andrews<sup>1)</sup>, however, says that typical streptococcus pyogenes has been isolated in his laboratory in the pathological department of the Philippine medical school from cases of malignant endocarditis, and Whitmore saw three typical cases of erysipelas<sup>2)</sup> in Manila. The streptococci found by Andrews were, according to his statement, of low virulence.

Guiteras and Menocal concur in the statement that Streptococcus pyogenes is rarely found in Havana and is then usually of low virulence. Lebreo and Coca studied the bacterial flora of purulent discharges occurring in the wards of two hospitals in Havana and succeeded only once in isolating a streptococcus. This organism formed chains in bouillon of 50 to 75 members and was obtained from a small abscess which was sharply circumscribed and was practically healed within forty-eight hours after it was opened.

Both of the non-chemical i. e. physical methods of sterilization (heating and filtration) proved inapplicable to the tumor vaccines. The epithelial proteids are coagulated at 50° C, which does not sterilize, and practically all of

1) By letter.

2) Unpublished.

these proteids are removed by filtration through a Berkefeld filter.

Of the chemical disinfectants, one of the least injurious to the serum antigen is known to be formaldehyde. Formaldehyde can be used in a 1:500 concentration in the preservation of sera for immunization purposes and it was considered possible, therefore, that the concentration required for complete sterilization of the infected vaccine might not greatly injure the epithelial antigens of malignant tumors.

Preliminary tests showed that blood corpuscles that had been in contact for forty-eight hours with 1:1000 formaldehyde were still capable of stimulating antibody production when injected in the small amount of 0.1 c.c. The addition of formaldehyde in the same concentration to a mixture of blood corpuscles and streptococci, sterilized the mixture within twenty-four hours.

Later experiments have shown that the antigenic property of surface epithelia is not injured by this method of sterilization.

The injection of 1:1000 formaldehyde causes severe though not unbearable pain for about five minutes, and in quantities of 10 c.c. has never produced any symptoms of intoxication.

In our endeavor to condense the report as much as possible we have suppressed all but the essential data in the protocols, and for the same reason have introduced the following abbreviations:

Under "Original Site of tumor" R = large recurrence; r = small recurrence; S = Sarcoma; C = Carcinoma.

Under "Operation" C.E. = complete excision; P.E. = partial excision.

Under "Preparation of Vaccine" A = grinding of the tumor tissue in a Baird and Tatlock lymph-machine with an equal volume of sterile physiological salt sol. followed by slow centrifugation for a few minutes, only the supernatant milky fluid being used for injection. B = the same as A except that the centrifugalization was omitted, the entire ground-up tissue being injected.

The numerals under the same heading indicate the number of grams of tumor tissue used for the injection.

The injections were always subcutaneous in various parts of the body — arm, leg, abdomen etc.

In every case the diagnosis was established by microscopical examination.

Cases No. 17, 18, 19, 26 and 36 present features of especial interest and for this reason the histories of these cases are given more fully.

Case 17. Mr. P. Attending surgeon Dr. Henry Beates. Recurrent Carcinoma of the buccal mucosa.

The recurrence involved the tissues of the right cheek and neck, which were so swollen and indurated as to interfere with the movement of the lower jaw. The tumor extended into the mouth at a point opposite the right lower molar teeth. At the time of the first injection the skin was intact over the tumor. Pain was absent.

April 21st. 1st. injection; 4 grams from Case 13, method B,  $\frac{1}{2}$  % Carbolic acid, in two portions subcutaneously over the abdomen.

May 5th. The patient, who lived at a considerable distance, is seen on this date for the first time since the treatment. At the point of injection on the left side a large abscess has developed, which, however, has not caused any systemic disturbance. The left injection spot is red and slightly edematous.

The hard swelling in the right cheek has disappeared and the cheek tissues are entirely normal in appearance and consistency. The portion of tumor situated beneath the right lower jaw is reduced in size and has become quite soft. The overlying skin is ulcerated. The buccal extension has also receded and has become ulcerated. Under ether anaesthesia the ulcerated opening in the skin is somewhat enlarged and with a curette a small quantity of soft, practically fluid tissue, representing the remains of the tumor that was situated beneath the jaw, is removed. A similar material in minimal amount it also obtained by curettement from that part of the tumor which had extended into the mouth. The abscess is opened, and a considerable quantity of pus released.

A second injection (5 grams from case 13, method A, Formaldehyde 1:500) is given.

May 12th. The ulcerated opening under the jaw, through which the curettement was made, is almost healed. Externally, no evidence of the tumor remains, but at the edge of the ulceration left in the mouth after the curettement are some short fringes of evidently malignant tissue. No infection has resulted from the second injection.

May 29th. Third injection ( $5\frac{1}{2}\%$  grams from case 13, method B, 1:1200 Formaldehyde).

Recurrence of the growth has begun again below the lower jaw on the right side.

June 30th. 4th injection ( $3\frac{1}{2}\%$  grams from case 92, method A,  $\frac{1}{4}\%$  Carbolic acid).

The tumor is growing more slowly than it did in the first recurrence. The patient received no further injections and died in September 1910.

Case 18. Mr. D. Attending surgeon Dr. J. B. Deaver. Primary epithelioma of the right cheek.

The growth, which was about 18 months duration, was situated at the juncture of the lower eyelid and the cheek and consisted in a deep ulcer which undermined the eyeball and already involved the bone at the lower orbital margin. The surface of the ulcer was continually moist with a thin sero-purulent exudation. On account of the involvement of the bone and the orbital tissues the tumor was considered inoperable. There was no pain.

April 21st. 1st injection (5 grams from Case 13, method B.  $\frac{1}{2}\%$  Carbolic acid) subcutaneously over the abdomen in three portions.

April 22nd. There is considerable tenderness upon pressure over the sites of injection but no redness and only slight swelling. There are no general symptoms of infection.

May 6th. The patient has been confined to his bed since April 23rd with local and general symptoms of septic infection. Two abscesses are opened. From cultures taken from the contained pus a streptococcus was later isolated. Exudation from the malignant ulcer in the cheek has ceased and a scab is forming in its base.

May 9th. The patient, who had had a cardiac lesion, succumbed to the effects of the toxæmia. The local infection was under control. At the time of death the cavity of the ulcer in the cheek was entirely filled with a scab, which was firmly attached to the contracting edges of the ulcer. Permission to exise the healing ulcer for microscopical examination could not be obtained.

Case 19. Mrs. R. Attending surgeon Dr. J. B. Deaver. Recurrent carcinoma of the breast. The recurrence consists of a hard mass situated in the right supraclavicular fossa and extending several inches upward in the neck.

April 21st. 1st injection (4 grams from case 3, method B,  $\frac{1}{2}\%$  Carbolic acid), subcutaneously over the abdomen, in two portions.

April 22nd. The patient began to feel ill in the morning and went to bed. Examination in the evening reveals considerable tenderness over the sites of injection, which, however, are neither red nor swollen. Temperature  $40^{\circ}$  C.

April 23rd. Local conditions are unchanged except that the tenderness is much diminished. Temperature 40° C.

May 7th. The patient says that "the hard lump in her neck is going away". On examination the growth is found to be markedly diminished in size. Temperature 39° C.

May 18th. The patient, who up to this time has steadily refused surgical interference, finally permits an exploratory incision over the sites of injection. A considerable quantity of pus and necrotic tissue is evacuated in which is found streptococcus pyogenes.

Dr. Deaver states that the carcinomatous mass has disappeared leaving only a hard nodule about the size of a grain of wheat half way between the clavicle and the mastoid process.

No further injections were given in this case and in a few months the growth recurred again.

Case 26. J. R. Attending surgeon Dr. W. H. Teller. Recurrent carcinoma of the buccal mucosa.

The recurrence consisted in a single hard mass which infiltrated all the tissues of the entire left cheek, producing a marked deformity of the facial contour, and extended into the mouth where its surface was superficially ulcerated. The skin overlying the tumor externally was firmly united to it but not ulcerated. There was no pain.

Dr. Teller considered the growth inoperable.

April 30th, 1910, 1st injection; 10 grams from case 13, method B,  $\frac{1}{8}$  % carbolic acid, subcutaneously over the abdomen in four portions.

May 4th. The patient has been in bed since the day after injections were given suffering with high fever and symptoms of severe local infection. The injection sites are red, swollen, hard and tender.

Temperature 40° C. No change has occurred in the tumor in the cheek.

May 9th. Temperature 36.8. The abscesses are opened. The swelling in the left cheek has almost entirely disappeared and the tissues of the cheek wall, have become normally soft. The portion of the tumor that extended into the mouth has also nearly disappeared.

May 17. Dr. Teller cures the ulcerating surface of in the mouth and finds that there is only a thin superficial layer of malignant tissue, the underlying structures being apparently entirely free from it.

May 18th. Second injection, 5 grams from case 13, method B, 1:1000 Formald. No infection followed the second injection. The tumor recurred again within a few weeks and the disease terminated fatally in the following September.



Case 36. Mrs. B. Attending physician Dr. David Mackey. Inoperable recurrent scirrhous carcinoma of the breast.

The recurrence had taken place in the neck behind the clavicle and consisted of several nodules of various sizes over which the skin while still intact, was red, oedematous and extremely sensitive. There was constant pain in the tumors as well as in the arm and hand of the affected side.

At the time of the first injection the patient had been confined to her bed for some weeks on account of the severe pain which was caused by the slightest movement of the head or the arm on the affected side. The appetite was lost and although food was not declined the patient was greatly emaciated. A fatal termination of the disease was expected in a few weeks.

May 7th, 1910, at 10 A.M. 5 grams of breast carcinoma from case 23, prepared according to method B with the addition of formaldehyde 1:1000 are injected in two portions into the abdominal wall. The severe pain due to the formalin subsides within ten minutes after the injection.

May 8th. In the evening the patient notices some lessening of the pain in the neighborhood of the tumors.

May 9th at 11 A.M. All pain and tenderness in the tumors have disappeared. The pain in the arm and hand, however, still persists. The patient is able to move her head and arm and feels hungry. The other evidences of inflammation have subsided in the skin overlying the nodules, which have apparently undergone a considerable decrease in size.

May 20. The largest tumor has still further decreased in size and has resolved into two small hard nodules. There is no local pain and that in the arm and hand has diminished.

May 24. Second injection; 6 grams from cases 45 and 4, method B, 1:1000 Formald.

July 8th. Third injection; 5 grams from case 95, method B,  $\frac{1}{4}\%$  Carbolic acid. The patient is up and work. The tumor nodules have still further decreased in size.

August 2. Fourth injection;  $12\frac{1}{2}$  grams from case 109, method B, no antiseptic. The tumor nodules are stationary.

August 18. Fifth injection; 9 grams from case 112, method B, no antiseptic. Local and general conditions are unchanged.

Sept. 12. Sixth injection; 6 grams from case 117, method B, no antiseptic. No change.

October 17th. Seventh injection;  $4\frac{1}{2}$  grams from case 125, method B, no antiseptic. The tumors are increasing in size. Pain and tenderness absent.

After the seventh injection, which was the last one given, the tumors continued to grow and the skin became ulcerated over them.

## Philadelphia

Case and sex	Attending Surgeon	Original site of tumor	Operation	Date of treatment	Source of material
1. m.	Frescoln	Penis	IV. 1. 1910, P.E.	IV. 4. 1910	Case 1
2. f.	J. B. Deaver	Breast	IV. 6. 1910, C.E.	None	—
3. f.	J. B. Deaver	Breast	IV. 6. 1910, C.E.	IV. 8. 1910 IV. 21. 1910	Case 3 „ 3
4. f.	J. B. Deaver	Breast	IV. 6. 1910, C.E.	None	—
5. f.	Dorrance	Breast <sup>1)</sup>	1909, C.E.	IV. 7. 1910 V. 6. 1910 IX. 16. 1910	Case 3 „ 25 „ 115
6. f.	Dorrance	Breast; R.	1909, C.E.	IV. 7. 1910 IV. 18. 1910	Case 2 „ 10
7. f.	J. B. Deaver	Breast; R.	1909, C.E.	IV. 9. 1910 IV. 18. 1910 IV. 30. 1910	Case 2 „ 10 „ 25
8. f.	Kercher	Breast; r. (4:2½ cm) ulcerated	—	IV. 8. 1910 IV. 19. 1910	Case 3 „ 10
9. m.	Codman	Forearm: large ulcer	—	IV. 18. 1910 V. 7. 1910 V. 30. 1910	Case 13 „ 13 „ 13
10. f.	J. M. Fischer	Breast	IV. 12. 1910, C.E.	IV. 20. 1910	Case 10

1) There was no recurrence when the vaccination was begun.

Series.

Preparation of vaccine	Antiseptic	Infection	Subsequent history
B 5	1:200 Carbolic	None	Died of gangrene resulting from operation.
—	—	—	—
B 3	None	None	Recurrence within a few months. The patient died Oct. 9, 1910.
B 2	"	Abscess: slight Temp.	
—	—	—	—
B 4	None	None	A small recurrent nodule appeared in the latter part of August. This increased during the next two months to the size of an English walnut.
B 7	1:400 Formald.	"	
A 16	None	"	
B 6	None	None	There was no apparent change after the first injection. A few days after the 2nd injection there was a marked change in the patient's general condition. The yellowish tint of the skin was replaced by a healthy pink; the appetite, which had been very poor, increased greatly, and the patient was in much improved spirits. The family declined further treatment. At no time was there any change in the size of the large shoulder recurrence.
B 10	"	"	
B 6	None	None	In this case there were no general symptoms of cachexia and no pain in the tumor itself. There was referred pain due to nerve trunk involvement, which was felt in the hand. This was not influenced by the treatment, nor did the tumor mass diminish after the injections.
B 15	1:200 Carbolic	"	
B 10		Streptococcic abscess	
B 5	None	None	IV. 19., the recurrent nodule measures 3:2 cm; the ulcer has diminished in extent and looks cleaner.
B 15	"	Large abscess; no general infection	V. 1., There has been no further reduction in the size of the tumor; the ulcer is almost closed; its surface is quite dry. Later this nodule began again to increase and others appeared in the neighborhood.
B 5	None	Severe streptococcic abscess	No change that could be attributed to the injections was observed in the malignant ulcer. Pain had been absent.
B 7 1/2	1:400 Formalin	None	Withdrawn from observation.
B 5	1:1000 Formald.	"	
B 10	None	None	

Case and sex	Attending Surgeon	Original site of tumor	Operation	Date of treatment	Source of material
11. m.	W. J. Roe	Cheek; R. Muc. membrane	IV. 13. 1910. 2) C. E.	IV. 16. 1910 V. 7. 1910	Case 11 " 13
12. f.	J. B. Deaver	Breast; R. Also large new tumor in opposite breast	IV. 15. 1908 1) IV. 22. 1910 2) Amp. left breast	IV. 18. 1910 V. 7. 1910 V. 21. 1910	Case 10 Various Case 45
13. m.	W. J. Roe	Cheek. Muc. membrane	IV. 16. 1910, P.E.	IV. 18. 1910	Case 13
14. m.	W. H. Long	Cheek; R. Muc. membrane	Jan. 1910	IV. 16. 1910 V. 7. 1910 V. 21. 1910	Case 11 " 13 " 13
15. m.	Codman	Skin of face. Extensive ulcer	None	IV. 18. 1910 V. 7. 1910 V. 29. 1910	Case 13 " 13 " 13
16. m.	—	Antrum	IV. 16. 1910, P.E.	IV. 20. 1910	Case 13
20. f.	W. W. Babcock	Breast; R.	1908 (?)	IV. 22. 1910 V. 8. 1910 V. 20. 1910 VI. 1. 1910 VII. 8. 1910	Case 3 Cases 21 & 23 Case 25 " 45 " 95
21. f.	J. B. Deaver	Breast	IV. 22. 1910, C.E.	V. 10. 1910	Cases 12 & 24
22. f.	G. M. Dorrance	Uterus	—	—	—
23. f.	Emerson	Breast; R.	IV. 21. 1910	None	—
24. f.	Emerson	Breast	IV. 19. 1910	None	—
25. f.	L. J. Hammond	Breast	IV. 27. 1910, C.E.	IV. 30. 1910	Case 25
27. m.	J. C. Bloodgood	Tibia; Sarcoma	IV. 29. 1910, P.E.	V. 2. 1910 V. 16. 1910	Case 27 " 27
28. f.	L. Brinkman	Breast; R.	—	V. 1. 1910 V. 22. 1910 IX. 22. 1910	Case 21 " 45 " 120
29. f.	J. B. Deaver	Breast. Atrophic Scirrhus	Inoperable weak heart	IV. 3. 1910 V. 11. 1910 VI. 20. 1910 VII. 18. 1910	Case 21 Cases 12 & 24 Case 45 " 105
30. f.	G. M. Dorrance	Breast	V. 2. 1910, C.E.	V. 29. 1910	Case 30

Preparation of vaccine	Antiseptic	Infection	Subsequent history
B 5 A 7	1:200 Carbolic 1:400 Form.	None "	Died of inanition due to inability to swallow. The tumor had not recurred.
B 20 B 5 B 6 $\frac{1}{2}$	None 1:200 Carbolic 1:1000 Form.	None " "	A second recurrence appeared in the left axilla about V. 14. 1910, which grew rapidly, the patient dying a few months later.
B 10	None	Streptococcic abscesses	The unexcised tumor mass increased in size during the two weeks succeeding the injections. The growth was painless.
B 7 A 5 B 12	1:200 Carbolic 1:400 Form. 1:800 "	None " "	48 hours after first injection the tumor became suddenly considerably enlarged, the phenomenon being accompanied with a feeling of increased tension without pain. This soon subsided and no further change has since been observed.
B 5 A 5 A 5	None 1:400 Form. 1:1000 "	Severe streptococcic abscesses None "	The exquisite tenderness and pain in the ulcer from which the patient had constantly suffered disappeared within 24 hours after the second injection. Otherwise, no change was noted. Several months later pain and tenderness in the tumor returned.
B 4	None	Streptococcic abscesses	Patient was withdrawn from observation soon after the injections were made.
B 4 A 5 B 9 B 8 A 14	1:200 Carbolic 1:1000 Form. 1:1000 " 1:1000 " 1:400 Carbolic	None " " " "	Pain was absent in the tumor masses themselves, but there was severe pain referred along the arm of the affected side. This was not relieved by the treatments, nor was the course of the disease influenced in any other respect. New nodules appeared during the intervals between the injections.
B 7 — — —	1:650 Form. — — —	None — — —	Recurrence has already taken place.
B 10 A 15 A 5	1:200 Carbolic None 1:1000 Form.	Streptococcic abscesses Staphylococcic abscesses. None	The disease recurred in September 1910. The metastatic glands in the groin were not influenced in any way by the injections.
B 10 B 6 $\frac{1}{2}$ A 11 $\frac{1}{2}$	1:200 Carbolic 1:800 Form. None	None " "	The pea sized recurrent nodule remained unchanged after the injection.
B 7 $\frac{1}{2}$ B 4 A 5 A 5 A 6 $\frac{1}{2}$	1:200 Carbolic 1:650 Form. 1:200 Carbolic None 1:1000 Form.	None " " " None	No noticeable change took place in the growth at any time after the injections were begun. Local recurrence was recently reported.

Case and sex	Attending Surgeon	Original site of tumor	Operation	Date of treatment	Source of material
31. f.	Emerson	Uterus; r., much local pain	Dec. 1909	V. 6. 1909 V. 17. 1910 VI. 1. 1910 VI. 16. 1910	— Case 39 „ 39 „ 39
32. f.	W. R. Nicholson	Rectum; muco-cutaneous juncture	Inoperable	V. 8. 1910 V. 21. 1910	Case 13 „ 13
33. m.	L. Brinkman	Lip; small ulcer 2 yrs. duration	—	V. 8. 1910 VI. 30. 1910	Case 13 „ 92
34. f.	J. B. Deaver	Breast	V. 7. 1910, C.E.	None	—
35. f.	J. B. Deaver	Breast	V. 7. 1910, C.E.	V. 11. 1910	Case 35
37. m.	J. B. Deaver	Colon; ad-carc.	V. 7. 1910, C.E.	None	—
38. f.	J. B. Deaver	Breast	V. 7. 1910, C.E.	V. 10. 1910	Case 12 and 24
39. f.	R. C. Norris	Uterus; ad. - carc. body	V. 7. 1910, C.E.	None	—
40. f.	L. J. Hammond	Uterus; ad-carc.	Inoperable	V. 11. 1910 V. 25. 1910	Case 40 Tissue obt. by curettage
41. m.	G. M. Dorrance	Prostate; enlargement	Inoperable	V. 11. 1910	Case 35
42. f.	A. H. Little	Uterus	V. 12. 1910	None	—
43. f.	Frescoln	Breast; R.	Jan. and Apr. 1909	V. 12. 1910 V. 26. 1910	Case 12 and 24 „ 4 „ 45
44. f. (59)	Frescoln	Lip; epithelioma	Inoperable	V. 24. 1910	Case 57
45. f.	Kennedy	Breast	V. 13. 1910, C.E.	None	—
46. f.	—	Breast; non-malignant	V. 13. 1910, C.E.	None	—
47. f.	J. B. Deaver	Breast	V. 16. 1910, C.E.	None	—
48. f.	J. B. Deaver	Breast	V. 16. 1910, C.E.	None	—
49. m.	Finney	Tongue; R.	Sept. 1909, Chas. Mayo	V. 17. 1910 VI. 1. 1910	Case 13 „ 13
50. f.	J. B. Deaver	Breast	V. 19. 1910	None	—
51. f.	W. W. Guilfoyle	Breast; R., considerable pain	None	V. 20. 1910	Case 25
52. m.	L. J. Hammond	Stomach	V. 21. 1910, L. glands removed	V. 25. 1910	Case 37
53. f.	L. J. Hammond	Breast	V. 21. 1910, C.E.	V. 24. 1910 VII. 8. 1910	Case 53 „ 95
54. f.	J. C. Bloodgood	(Same as Case 89)			—
55. m.	G. M. Dorrance	Tibia; sarcoma	V. 21. 1910	None	—
56. f.	A. C. Wood	Breast	V. 21. 1910	None	—
57. f.	Frescoln	Cheek; mucous membrane	V. 23. 1910	None	—

Preparation of Vaccine	Antiseptic	Infection	Subsequent history
A 3 B 6 $\frac{1}{2}$ A 6 A 6	1:400 Form. 1:1000 " 1:1000 " 1:400 Carbolic	None " " "	The first injection was followed by no change. Within 48 hours after the 2nd "injection" pain had practically disappeared. The general condition was greatly improved, but the growth of the tumor continued even during the treatment.
A 8 B 6 A 8 A 3 $\frac{1}{2}$ —	1:400 Form. 1:800 " 1:400 Form. 1:400 Carbolic —	None " None " —	The growth increased in extent during the treatment. The appearance and extent of the ulcer remained the same after the injections.
A 5 —	1:650 Form. —	None —	Withdrawn from observation.
B 5 —	1:650 Form. —	None —	There has been no recurrence.
A 7 A 5	1:650 Form. 1:1000 "	None "	No improvement followed these injections and the patient succumbed two months later.
A 5 —	1:650 Form. —	None —	No change followed the treatment. Diagnosis uncertain.
A 5 A 5 A 6	1:1000 Form. 1:1000 " 1:1000 Form.	None " None	No improvement. Died suddenly June 3rd 1910. No improvement.
— — — —	— — — —	— — — —	— — — —
B 7 B 9 —	1:650 Form. 1:1000 " —	None None —	The growth increased during treatment and death has since occurred. Pain was absent before the injections.
B 8 B 6	1:650 Form. 1:1000 Form.	None None	The local pain was greatly relieved. There was no other change. The progress of the disease was not perceptibly influenced.
A 7 A 8 — — — —	1:1000 Form. 1:800 Carbolic — — — —	None None — — — —	There has been no recurrence.

Case and sex	Attending Surgeon	Original site of tumor	Operation	Date of treatment	Source of material
58. f.	J. B. Deaver	Breast; r.	1909	V. 24. 1910 VI. 7. 1910	Case 53 „ 85
59. f.	Frescoln	(See 44)	—	—	—
60. m.	Frescoln	Skin; epithelioma	1909, C.E.	V. 30. 1910 Prophylactic	Case 13 and 57
61. m.	A. A. Uhle	Bladder	V. 24. 1910, P.E.	V. 26. 1910	Case 61
62. f.	L. Brinkman	Breast; r.	1909, C.E.	V. 24. 1910 VII. 8. 1910 IX. 20. 1910	Case 4 and 45 „ 95
63. m.	Henry Beates	Rectum	V. 27. 1910 Curettement	V. 26. 1910	Case 37
64. f.	J. B. Deaver	Uterus	V. 25. 1910, C.E.	None	—
65. f.	J. B. Deaver	Breast	V. 25. 1910, C.E.	None	—
66. f.	Harry Deaver	Breast; R.	V. 26. 1910, P.E.	V. 27. 1919	Case 66
67. f.	Frescoln	Breast; R.	1909	V. 27. 1910	Case 4 and 45
68.	Untreated	—	—	—	—
69. m.	W. W. Babcock	Tongue; R.	1909	V. 29. 1910 VI. 14. 1910 VI. 15. 1910 VI. 16. 1910 VI. 30. 1910	Case 13 „ 57 „ 57 „ 57 „ 92
70. m.	Hewson	Face; R.	Inoperable	V. 29. 1910	Case 13 and 57
71. m.	Hewson	Face; R.	Inoperable	V. 29. 1910	Case 13 and 57
72. f.	Hewson	Breast; r.	—	V. 29. 1910	Case 30
73. m.	L. H. Adler	Rectum non-malignant	V. 28. 1910, C.E.	VII. 14. 1910	Case 73
74.	G. M. Dorrance	Branchial Arch.	1) 1909 2) VII. 12. 1910	V. 30. 1910 VI. 9. 1910 VII. 12. 1910	Case 13 and 57 „ 90 „ 74
75. m.	Frescoln	Liver (Autopsy material)	—	—	—
76. f.	W. W. Babcock	Breast	V. 28. 1910	None	—
77. m.	J. B. Deaver	Stomach	V. 28. 1919, C.E.	None	—
78. m.	J. B. Deaver	Neck; S.	V. 28. 1910, C.E.	None	—
79.		Non malignant-tumor	—	—	—
80. f.	J. B. Deaver	Breast	V. 30. 1910, C.E.	None	—
81. f.	J. B. Deaver	Stomach	Inoperable	VI. 1. 1910	Case 77
82. f.	J. B. Deaver	Stomach	Inoperable	VI. 1. 1910	Case 77
83. f.	W. W. Babcock	Breast	V. 31. 1910, C.E.	None	—



Preparation of vaccine	Antiseptic	Infection	Subsequent history
A 7	1:1000 Form.	None	No improvement. The patient has since succumbed. The recurrent growth was at no time painful.
A 7½	1:650 "	None	
—	—	—	—
B 1½	1:1000 Form.	None	No recurrence.
A 4³/₁₀	1:1000 Form.	None	Growth of the tumor continued.
B 5	1:1000 Form.	None	The tumor increased slightly during the treatment.
A 14	None	None	
A 11	None	None	The patient died a few weeks later of an intercurrent affection at which time the local conditions were still much improved probably as result of curettement.
B 13	1:1000 Form.	None	
—	—	—	—
—	—	—	—
A 5	1:800 Form.	None	Withdrawn from observation.
B 5	1:1000 Form.	None	No improvement; pain had been absent.
—	—	—	—
B 5	1:1000 Form.	None	No improvement followed the injections, and the patient died in September 1910. Pain had not been present.
A 2½	1:200 Carbolic	"	
A 2½	1:200 "	"	
A 6	1:200 "	"	
A 3	1:400 "	"	
B 5	1:1000 Form.	None	No improvement.
B 5	1:1000 Form.	None	No improvement.
A 6½	1:1000 Form.	None	No improvement.
A 8½	1:400 Carbolic	Staphylococcic abscesses	No recurrence.
B 3	1:1000 Formald.	None	The course of the disease was not affected by the treatment. Pain had not been present.
B 10	None	"	
A 6	None	Staph. abscess.	
—	—	—	—
—	—	—	—
—	—	—	—
—	—	—	—
—	—	—	—
—	—	—	—
B 5	1:2000 Form.	Localized Streptococcic abscesses	No improvement.
B 10	1:2000 Form.	Localized Streptococcic abscesses	No improvement.
—	—	—	—

Case and sex	Attending Surgeon	Original site of tumor	Operation	Date of Tumor	Source of material
84. f.	W. W. Babcock	Breast	V. 31. 1910, C.E.	None	—
85.		Non malignant	—	—	—
86. f.	J. B. Deaver	Cervix	Inoperable	VI. 2. 1910 IV. 20. 1910	Case 39 „ 119
87. m.	J. B. Deaver	Pancreas	Inoperable	VI. 2. 1910	Case 75
88.		Non malignant tumor	—	—	—
89. f.	J. C. Bloodgood	Breast	1) V. 19. 10, P.E. 2) VI. 5. 10, C.E.	VI. 5. 1910 VII. 8. 1910	Case 83 „ 98
90. m.	C. F. Nassau	Testicle, with abdominal metastases	VI. 9. 1910, P.E.	VI. 9. 1910 VII. 1. 1910	Case 90 „ 90
91.		The same as 74	—	—	—
92. m.	Frescoln	Branchial Arch.	VI. 25. 1910, C.E.	VII. 13. 1910	Case 92
93. m.	G. M. Dorrance	Tongue; R.	1) 1909 2) VI. 13. 1910, P.E. <sup>1)</sup>	VI. 22. 1910 VII. 1. 1910 VII. 12. 1910	Case 45 „ 92 „ 73
94. m.	L. H. Adler	Rectum	VII. 5. 1910, P.E.	VII. 5. 1910	Case 94
95. f.	Frescoln	Breast	VII. 5. 1910, C.E.	None	—
96. f.	J. B. Deaver	Breast	VII. 7. 1910, C.E.	None	—
97. f.	Weiskotten	Uterus	VII. 8. 1910	None	—
98. f.	J. C. Bloodgood	Breast	VII. 8. 1910, C.E.	VII. 8. 1910	Case 98
99. f.	L. J. Hammond	Breast; R. <sup>2)</sup>	1909	VII. 10. 1910	Case 98
100. f.	J. B. Deaver	Breast	VII. 13. 10, C.E.	None	—
101. f.	J. B. Deaver	Breast	VII. 13. 10, C.E.	None	—
102. f.	J. B. Deaver	Breast	VII. 13. 10, C.E.	None	—
103. f.	J. C. Bloodgood	Breast; ulcerated axillary metast.	VII. 13. 10, C.E.	VII. 14. 1910	Case 101 & 102
104. f.	J. C. Bloodgood	Breast-early	VII. 9. 10, C.E.	VII. 14. 1910	Cases 101 & 102
105. f.	J. B. Deaver	Breast	VII. 16. 10, C.E.	None	—

1) On incision of the large hard mass in the neck, the interior was remained, which resembled a mucous lining. Section of this wall showed tissue was invaded in only a few places and not deeply.

2) The patient complained of severe "stinging" pain in the tumor and

Preparation of vaccine	Antiseptic	Infection	Subsequent history
—	—	—	—
—	—	—	—
A 5½	1:1000 Form.	None	The course of the disease was not influenced by the injections.
A 7	None	"	
A 10	1:1000 Form.	None	No favorable change in the patients condition was noted after the injections.
—	—	—	—
A 3	1:1000 Form.	None	There has been no recurrence.
A 16	None	"	
A 10	None	None	No favorable change was observed to follow the injections, and the patient became progressively worse.
A 18	"	Mild local abscesses	
—	—	—	—
A 9½	None	None	Died Oct. 1910. Recurrence in the lungs.
A 5	1:400 Carbolic	None	There was no marked improvement in the local condition during the course of treatment. Pain had been absent.
A 8	None	"	
A 6	"	Streptococc. abscesses	
A 7	None	None	No change in the unexcised mass was observed during the next few weeks, and the patient has since grown progressively worse. Pain had not been present.
—	—	—	—
—	—	—	—
—	—	—	—
A 14	None	None	Rapid recurrence. Death in six months.
A 25	None	None	Within 48 hours after the injection the "stinging" pain in the tumor had disappeared; the pain in the arm persisted. Otherwise no change was observed beyond the appearance, after two weeks, of new nodules.
—	—	—	—
—	—	—	—
—	—	—	—
A 14	None	None	Cerebral recurrence Sept. 8th, 1910.
A 14	None	Staphylococcic abscesses	No recurrence up to the present time.
—	—	—	—

found to be liquified, and upon emptying the cavity only a thin wall an epithelial covering of one or two cell layers. The underlying connective

a sharp lancinating pain down the arm of the affected side.

Case and sex	Attending Surgeon	Original site of tumor	Operation	Date of treatment	Source of material
106. m.	J. C. Bloodgood	Neck 1)	1) VII. 16. 1910 2) VII. 21. 1910	VII. 16. 1910 VII. 22. 1910	Case 106 „ 106
107. m.	Frescoln	Stomach	VII. 18. 1910	—	—
108. f.	B. C. Hirst	Breast; r.	VIII. 1. 10, C.E.	X. 2. 1910	Case 120
109. f.	J. C. Bloodgood	Breast, large axillary metas.	VIII. 1. 10, C.E.	X. 2. 1910	Case 109
110.	G. M. Dorrance	Stomach	VIII. 3. 1910	None	—
111. f.	J. C. Bloodgood	Breast	VIII. 12. 10, C.E.	VIII. 13. 1910	Case 111
112. f.	W. A. Steele	Breast	VIII. 16. 10, C.E.	VIII. 18. 1910	Case 112
113.	Dorrance	Patellar bursa (gumma)	VIII. 18. 10, C.E.	None	—
114.	omitted	—	—	—	—
115. f.	L. Brinkman	Breast	VIII. 29. 10, C.E.	VIII. 29. 1910 IX. 20. 1910	Case 115 „ 119
116. f.	Dorrance	Breast	IX. 6. 1910, C.E.	None	—
117. f.	D. L. Gifford	Breast	IX. 10. 1910, C.E.	X. 1. 1910	Case 117
118. f.	S. E. Tracey	Uterus (cervix)	IX. 14. 1910, P.E.	None	—
119. f.	J. B. Deaver	Breast	IX. 17. 1910, C.E.	None	—
120. f.	J. B. Deaver	Breast	IX. 17. 1910, C.E.	None	—
121. f.	Dorrance	Breast; R.	IX. 24. 1910, P.E.	IX. 25. 1910 X. 19. 1910 XI. 5. 1910	Case 121 „ 125 „ 127
122. f.	A. S. Taylor	Breast	IX. 29. 1910, C.E.	X. 1. 1910	Case 122
123. f.	A. S. Taylor	Breast	IX. 29. 1910, C.E.	X. 1. 1910	Case 122
124. m.	R. C. Norris	Bladder	X. 6. 1910, P.E.	None	—
125. f.	C. F. Nassau	Breast	X. 14. 1910, C.E.	X. 19. 1910 XI. 5. 1910	Case 125 „ 127
126. f.	Dorrance	Uterine fibroid	X. 28. 1910, C.E.	None	—
127. f.	J. B. Deaver	Breast	X. 29. 1910, C.E.	None	—
128. f.	W. H. Teller	Breast	XI. 1. 1910, C.E.	XI. 5. 1910	Case 128
129. f.	Richardson (Boston)	Breast; R.	Inoperable	XII. 13. 1910 XII. 28. 1910	Case 130 „ 131
130. f.	Richardson	Breast	XII. 10. 10, C.E.	XII. 13. 1910	Case 130
131. f.	Richardson	Breast	XII. 26. 10, C.E.	None	—
132 m.	Frescoln	Lip; epithelioma	VII. 20. 10, C.E. VIII. 17. 10, C.E.	VIII. 17. 10	Case 132

## Havana

1. m.	Menocal and Nogueira	Deep tissue of neck. Branchial arch; C.	1) IX. 5. 10, P.E. 2) IX. 21. 10, P.E.	IX. 5. 1910 IX. 21. 1910	Case 1 „ 1
-------	----------------------	---	---	-----------------------------	---------------

1) Lympho-sarcoma.

Preparation of vaccine	Antiseptic	Infection	Subsequent history
B 3 A 9	1:400 Carbolic	None	The disease has progressed since the injections.
—	—	—	—
10 grs. A 9	None None	None None	Local recurrence within a few months. Withdrawn from observation.
—	—	—	—
A 8½ A 23	None None	None None	Died from intercurrent affection. No recurrence at the last report.
—	—	—	—
—	—	—	—
A 15 A 9	None "	None "	Local recurrence was recently reported.
—	—	—	—
B 10	None	None	No recurrence at the last report.
—	—	—	—
—	—	—	—
—	—	—	—
B 15 A 12 A 5	None " "	None " "	The surgically inaccessible unexcised portion of the tumor resumed growth during the treatment.
A 6	None	None	Withdrawn from observation.
A 6	None	None	Withdrawn from observation.
—	—	—	—
A 16 A 5	None	None	Died Dec. 1910. Pulmonary metastasis.
—	—	—	—
—	—	—	—
A 7½	None	None	Quick recurrence and death in a few months.
B 15 B 25	None "	Small local abscesses	No improvement at any time.
B 15	None	None	—
—	—	—	—
A 2½	None	None	No recurrence.
series.			
A 11 B 7½	None "	Local abscesses " "	The growth of the unexcised tumor masses continued unaffected in any way by the injections. The tumor had never given any pain.

Case and sex	Attending Surgeon	Original site of tumor	Operation	Date of treatment	Source of material
2. f.	Nogueira	Neck; S.	IX. 6. 1910, P.E.	IX. 6. 1910	Case 2
3. m.	Nogueira	Lower Jaw	IX. 8. 1910, P.E.	IX. 8. 1910	Case 3
4. m.	Menocal	Tongue; C.	IX. 10. 1910, P.E.	None	—
5. m.	Nogueira	Scrotum; S.	IX. 13. 1910, C.E.	IX. 13. 1910	Case 5
6. m.	Nogueira	Muc. membrane of cheek	IX. 13. 1910, P.E.	IX. 13. 1910 IX. 30. 1910	Case 6 „ 6
7. m.	Menocal	Scalp, Epith.	IX. 13. 1910, C.E.	IX. 13. 1910	Case 7
8. m.	Ruiz	Muc. membrane of cheek; C.	IX. 15. 1910, P.E.	IX. 15. 1910	Case 8
9. f.	Nogueira	Muc. membrane of cheek; C.	IX. 18. 1910, P.E.	IX. 18. 1910	Case 9
10. m.	Carrera	Inguinal region; S.	IX. 17. 1910, C.E.	None	—
11. f.	E. Fortun	Cervix; C.	IX. 28. 1910, C.E.	IX. 28. 1910	Case 11
12. m.	Nogueira	Branchial Arch.	1) VIII. 2. 10, C.E. 2) X. 1. 1910, P.E.	X. 1. 1910	Case 12
13. m.	Chas. Finlay	Skin, eyelid. Ulcer. Epithelioma	None	IX. 30. 1910	Case 7
14. m.	Nogueira	Palate; C.	IX. 30. 1910, C.E.	IX. 30. 1910	Case 6
15. m.	Finlay	Skin; Ep. Small ulcer	None	X. 11. 1910	Case 7

The question as to the existence in the blood of human cancer patients, of specific antibodies that have been produced under the antigenic stimulation of any substances contained in the malignant tissue must be regarded as unsettled.

The results of the study of human cancer sera with the use of the meiotagmin reaction of Ascoli and Izar demonstrate qualitative differences between the sera of many of these individuals and those of normal persons, which may or may not be due to the presence of cancer anti-bodies. The use of the anaphylactic shock after passive sensitization as an indicator of the presence of tumor-specific antibodies in human cancer patients was first made by H. Peiffer and Finsterer<sup>1)</sup>. These authors found, first;

1) Wiener klin. Wochenschr., 1909, No. 28 and No. 36.

Preparation of vaccine	Antiseptic	Infection	Subsequent history
A 10	None	None	The small unexcised portions of the tumor increased rapidly after the treatment. The tumor had never been painful.
A 14	None	None	No recurrence at the last report. The tumor was not malignant.
—	—	—	—
A 10	None	Small abscesses	Local recurrence in four months.
A 8	None	None	The very small unexcised portion of tumor increased rapidly immediately after the first injection and this growth was not affected by second treatment.
A 9	"	"	The tumor was painless.
A 11	None	Local abscesses	No recurrence.
A 12	None	Local abscesses	The growth of the large unexcised masses of tumor continued uninfluenced by the injections. The tumor had never given any pain.
A 8	None	None	Died three weeks after the operation of inanition, on account of inability to swallow.
—	—	—	—
A 7	None	None	Withdrawn from observation.
B 10	None	None	The growth continued rapidly after the injections.
B 9½	None	Local abscesses	Two days after the injection was made the severe pain in the malignant ulcer disappeared; otherwise no change has been observed.
A 8½	None	None	Recurred within a few weeks with rapid growth.
B 9½	None	Abscess	No change.

that the intraperitoneal injection of the juice of human carcinoma into normal guinea-pigs or into guinea pigs that had received, 48 hours previously, injections of serum from normal human beings, produced no general anaphylactic symptoms nor fall of the body temperature; secondly; that the intraperitoneal injection of the carcinoma juice into guinea-pigs that had received, 48 hours previously, an injection of the serum of the bearer of the carcinoma, or of another individual suffering from such a tumor, exhibited both the outward symptoms of anaphylactic shock and a considerable temperature drop.

E. Ranzi<sup>1)</sup> repeated the foregoing experiments, and was unable to confirm the findings of Pfeiffer and Finsterer. More recently Pfeiffer<sup>2)</sup>

1) Wiener klin. Wochenschr., 1909, No. 40.

2) Zeitschr. f. Immunitätsforsch., Bd. 4, 1910, p. 458.

has published a larger series of experiments by which he upholds the results obtained with Finsterer. According to these experiments tumor-specific antibodies are demonstrable in the blood of individuals suffering from carcinoma but not of these afflicted with sarcoma or non-malignant tumors.

With the Bordet-Gengou reaction of complement-deviation<sup>1)</sup>, different results have been obtained by different observers. Lüdke believed he could show, with the serum of two cases of human carcinoma, a slight specific complement-deviation. Simon and Thomas<sup>2)</sup>, using the hemolytic system, hen corpuscles — anti-hen corpuscle — rabbit serum — guinea-pig complement, obtained complement deviation in 24 out of 37 cases of malignant disease, by uniting the patient's sera with a quantity of cancer extract which by itself was not anti-complementary. They obtained no positive reaction in 50 normal or otherwise diseased individuals.

Barratt<sup>3)</sup>, on the other hand, although he was able to show a specific complement fixation upon uniting the sera of immunized mice with mouse-tumor extract, could not produce the same phenomenon with the sera of human cancer patients.

Ranzi<sup>4)</sup> injected 10 ccm. of a paper-filtered cancer extract into two cancer patients and after one week examined the two sera with the method of complement deviation. His results were entirely negative.

Lebreo and Coca examined the sera of a number of cancer patients, who had received large injections of tumor tissue, in order to see whether such injections had stimulated the production of demonstrable antibodies. Both the reaction of complement deviation and that of specific precipitation were lacking in all these sera. The protocols of the experiments follow. The case numbers refer to the Havana series.

Case 1. Male; carcinoma arising in the epithelial vestigia of the branchial arch. Operation (Menocal) Sept. 5th, 1910; partial excision of the growth. The fluid decanted from four and a half grams of the tumor after grinding with twelve cubic centimeters of physiological salt solution without the addition of any antiseptic is injected on the day of the operation. The unexcised mass grew rapidly after the operation and on Sept. 21st, 1910, a second operation (Nogueira) was undertaken at which practically all of the tumor was removed. At the same time a few cubic centimeters of blood were collected from the wound.

Case 3. Male; sarcoma of the lower jaw? Section showed the tumor to be not malignant. Operation (Nogueira) Sept. 8th; complete excision of the growth. The fluid, decanted from 14 grams of the malignant tissue ground up with 6 ccm. of physiological salt solution, is injected, without

1) *Verh. d. Physik.-Med. Gesellsch. zu Würzburg*, Bd. 39, 1907, p. 131.

2) *Journ. Exper. Med.*, Vol. 10, 1908,

3) *Brit. med. Journ.*, 1910, Vol. 2.

4) *Arch. f. klin. Chir.*, Bd. 84, 1907.



the addition of any antiseptic, on the day of the operation. Blood was taken on September 20th.

Case 6. Male; carcinoma arising in the mucous of the cheek. Operation (Nogueira) September 13, 1910; almost complete removal of the growth. The fluid decanted from eight grams of the tumor tissue, after grinding with an equal volume of sterile physiological salt solution; without the addition of any antiseptic, is injected on the day of the operation. Blood taken Sept. 20.

Case 7. Male; epithelioma of the scalp with metastases to the posterior cervical glands. Operation (Menocal) Sept. 1910. Complete excision of the malignant tissue. The fluid decanted from eleven grams of the tumor after grinding with 15 ccm. of physiological salt solution, without the addition of any antiseptic, is injected on the day of the operation. Blood taken Sept. 20th.

Case G. B., male; chronic infection of the leg. Non-malignant. Blood taken Sept. 20, 1910.

Case 9. Female, carcinoma arising in the mucous membrane of the cheek. Operation (Nogueira) Sept. 19, 1910; almost complete removal of the growth.

Precipitin Test. Sept. 21, 1910.

Eight grams of the tumor tissue from case 9 are passed twice with 20 ccm. of physiological salt solution through a Baird and Tatlock lymph machine, and one cubic centimeter of the resultant thick fluid shaken with 9 ccm. of the salt solution. This 1:10 diluted is sharply centrifugalized and the decanted pinkish, opalescent fluid used as "antigen".

To the unheated sera of cases 3, 6 and 7 diluted one volume in five and taken in quantities representing  $\frac{1}{10}$  ccm. of the original sera is added the antigen in quantities of  $\frac{1}{10}$ ,  $\frac{1}{20}$ ,  $\frac{1}{40}$ ,  $\frac{1}{80}$ ,  $\frac{1}{160}$  and  $\frac{1}{320}$ . The well shaken mixtures are allowed to stand over night in the ice-box. On the following morning precipitation was found to have taken place in all the tubes. This precipitation was greater where the larger amounts of antigen had been used but not greater with one serum than with another.

Five ccm. of the "antigen" were mixed with 1 ccm. of the control serum G. B. and allowed to remain over night in the ice-box. The mixture was then freed from the precipitate by sharp centrifugation and decantation. To  $\frac{1}{2}$  ccm. of the unheated sera 3, 6 and 7 is added the treated antigen in quantities of  $\frac{1}{10}$ ,  $\frac{1}{20}$ ,  $\frac{1}{40}$ ,  $\frac{1}{80}$  and  $\frac{1}{160}$  ccm. and the shaken mixtures are left in the ice-box over night. On the following morning all the mixtures were still quite clear.

After the removal, from the tumor extract, of the non-specific serum precipitable substance, no further precipitation could be obtained by mixing the treated tumor extract with the serum of cancer patients.

#### Complement fixation Test.

Two antigens were used for this reaction, one from the tumor tissue of case 6, the other from that of case 7. In each instance the material was ground with an equal volume of salt solution, and after dilution of

the resulting semi-fluid emulsion 1:10 in case 6 and 1:20 in case 7 it was centrifugalized and the supernatant opalescent fluid poured off. Neither of these antigen fluids were hemolytic for sensitized ox-blood corpuscles in quantities of  $\frac{8}{10}$  ccm. Both fluids were slightly anti-complementary in quantities of  $\frac{8}{10}$  ccm. ( $\frac{1}{30}$  ccm. of guinea-pig's serum, after two hours contact at room temperature  $30^{\circ}$  C with this quantity, producing only partial hemolysis of 1 ccm. of 5% sensitized (2 doses —  $\frac{1}{640}$  ccm.) ox corpuscles within the usual period of observation.

The sera Nos. 1, 6, 7, G. B. and a fifth normal serum C inactivated by heating at  $58^{\circ}$  C for  $\frac{1}{2}$  hour did not inhibit the complementary action of  $\frac{1}{30}$  ccm. of guinea pig's serum in quantities of  $\frac{4}{10}$  ccm.

For the fixation test two amounts of the two antigen extracts were used, namely  $\frac{4}{10}$  and  $\frac{2}{10}$  ccm. the larger quantity being just under the slightly anti-complementary dose.  $\frac{1}{30}$  ccm. of guinea pig's serum and  $\frac{2}{10}$  ccm. of the inactivated sera were used.

None of the cancer sera gave the least deviation of even half the usual dose of guinea pig complement, with  $\frac{4}{10}$  ccm. or  $\frac{2}{10}$  ccm. of either antigen extract.

#### Complement-fixation experiment.

After 2 hours at room temperature 1 c. c. 5% sensitized (2 doses) ox corpuscles in each tube					In each tube $\frac{1}{20}$ c. c. normal guinea-pig serum		After 2 hrs. $37^{\circ}$ C
Sera inactivated $\frac{1}{2}$ hr. at $58^{\circ}$ C					Antigen Case 6	Antigen Case 7	Hemolysis
Ser. 1	Ser. 6	Ser. 7	Ser. G.B.	Ser. C			
2:10	.	.	.	.	4:10	.	Complete
2:10	.	.	.	.	2:10	.	"
2:10	.	.	.	.	.	4:10	"
2:10	.	.	.	.	.	2:10	"
.	2:10	.	.	.	4:10	.	"
.	2:10	.	.	.	2:10	.	"
.	2:10	.	.	.	.	4:10	"
.	2:10	.	.	.	.	2:10	"
.	.	2:10	.	.	4:10	.	"
.	.	2:10	.	.	2:10	.	"
.	.	2:10	.	.	.	4:10	"
.	.	2:10	.	.	.	2:10	"
.	.	.	2:10	.	4:10	.	"
.	.	.	2:10	.	2:10	.	"
.	.	.	2:10	.	.	4:10	Trace <sup>1)</sup>
.	.	.	2:10	.	.	2:10	"
.	.	.	.	2:10	4:10	.	Complete
.	.	.	.	2:10	2:10	.	"
.	.	.	.	2:10	.	4:10	"
.	.	.	.	2:10	.	2:10	"

1) There was not enough serum at our disposal to enable us to repeat the test in this case.

We see that even after the injection of relatively large quantity of malignant tissue the usual methods of precipitation and complement-fixation fail to demonstrate specific antibodies in the blood of cancer patients.

These tests were repeated with sera from three other cases, which were obtained on the eighth day following the injection of about 10 grams of tumor tissue, with identical negative results.

It is to be observed that the cancer sera examined by us were obtained after only one injection of the tumor tissue. The recently published experiments of Halpern<sup>1)</sup> make it appear possible that after repeated injections of tumor tissue the Bordet-Gengou antibodies might be demonstrable.

The conclusions of this investigation, so far as our experience is concerned, will be drawn from the results of the vaccination treatment in 79 cases, the other numbers of the case record being excluded, for obvious reasons<sup>2)</sup>, from consideration.

The 79 cases have been classified under three headings as follows:

I. Cases treated after complete removal of the tumor (24 cases):

- a) Without the use of any antiseptic: \*3 (2), \*5 (3), 89 (1), \*92 (1), \*98 (1), \*103 (1), 104 (1), \*108 (1), 112 (1), \*115 (2), 117 (1), \*125 (2), \*128 (1), 130 (1), 132 (1), \*H5 (1), H7 (1), H14 (1);
- b) with the use of carbolic acid or formaldehyde: \*21 (1), \*25 (1), \*30 (1), 38 (1), 53 (2), 60 (1).

II. Cases in which small recurrences or early primary tumors were present at the beginning of the treatment (17 cases):

- 8 (2), 18 (1), 22 (4), 27 (2), 28 (3), 31 (4), 32 (2), 33 (2), 58 (2), 61 (1), 62 (3), 72 (1), 106 (2), H2 (1), H6 (2), H13 (1), H15 (1).

1) Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 11, 1911, Heft 5.

2) The numbers were not used, or the patients were not treated, or died shortly after operation, or were withdrawn from observation etc.

\* The asterisks indicate those cases in which recurrence has already taken place. The numerals in parentheses indicate the number of injections. The numbers preceded by the letter H, are taken from the Havana series.

## III. Large tumors (38 cases):

6 (2), 7 (3), 9 (3), 12 (3), 13 (1), 14 (3), 15 (3), 16 (1),  
 17 (3), 19, 20 (5), 26 (1), 29 (4), 36 (7), 40 (2), 43 (2),  
 44 (1), 49 (2), 51 (1), 52 (1), 67 (1), 69 (5), 70 (1), 71 (1),  
 74 (1), 81 (1), 82 (1), 86 (2), 87 (1), 90 (2), 93 (3), 94 (1),  
 99 (1), 121 (3), 129 (2), H 1 (2), H 8 (1), H 12 (1).

Of all these cases, those in which the most striking changes were seen to follow the injections were nos. 17, 18, 19, 26 and 36. Four of these bore large tumors while in the fifth, No. 18, the amount of tumor tissue present was relatively small.

In cases 17, 19 and 26 there was a great reduction in the size of the tumors amounting, in the last two cases, to an almost complete disappearance of the malignant tissue. In none of these three cases was the reduction in size accompanied with any local evidences of inflammation in the neighborhood of the tumors, and in at least one of them the change occurred rapidly, i. e., between May 4th and May 9th. In case 18 the ulcer lost its malignant character and was unquestionably in the process of healing.

In judging the significance of the remarkable observations just described, it is necessary to take into consideration certain possibilities other than the development in these patients of a destructive immunity against the malignant tumors.

The first question to be disposed of is whether the possibility of a spontaneous temporary retrogression can be admitted to explain the changes seen in the four cases.

Spontaneous retrogression of human cancers is not unknown and has been seen to take place in undoubted malignant disease of considerable extent<sup>1</sup>). Mere reflection, however, upon the great infrequency of such an occurrence, suffices to exclude the coincidence of spontaneous retrogression in all of the four cases under consideration, as an explanation of the changes observed, particularly since those changes took place, without exception, within two weeks after the injections.

1) See Senger, *Verh. d. Deutsch. Ges. f. Chir.*, 1894; v. Czerny, *Zeitschr. f. Krebsforsch.*, Bd. 5, 1907; also Gaylord and Clowes, *Surg. Gyn. and Obst.*, 1906; Orth, *Zeitschr. f. Krebsforsch.*, 1904; Wells, *Journ. Amer. Med. Assoc.*, 1909 (lit.) and many others.

The second possible explanation of the phenomenon presented by these four cases is found in the fact that in all of them the injections resulted in a more or less severe streptococcic infection.

The influence which streptococcic infection may exert upon the course of malignant disease, both of epithelial of and connective tissue origin has long been recognized.

Volkman<sup>1)</sup> in 1857, first noticed the retrogression of a „fibroma“ following an attack of erysipelas.

Busch<sup>2) 3)</sup> next reported one case of multiple sarcoma in which, under the influence of an erysipelas that resulted from the excision of one of the tumor nodules, all the other tumors disappeared and the patient remained free from recurrence. He was the first to attempt (in two cases) a therapeutic application of the observed influence of the streptococcic infection. In both instances retrogression of the tumors was seen but neither case was cured.

Streptococcic inoculations were subsequently applied, sometimes successfully, in the treatment of malignant tumors by Fehleisen, Verneuil, Ricochon, Pamard, Lussana, Biedert, Lassar, Janicke and Coley, and the influence of accidental infection was also described by Mosengeil, Bruns, Hahn, Neelsen, Nelaton, Dauchez, Powers and Dowd, Czerny, Coley, Rovsing and others.

A study of the observations of all these writers suffices to establish beyond any doubt, 1st, that malignant diseases may be favorably influenced and even cured by an intercurrent streptococcic infection, and 2nd, that the influence of such infection upon sarcoma is considerably greater than its influence upon carcinoma.

But it was quickly learned that the inoculation of the streptococcus cannot be practiced with impunity. Fatal infections resulted in a number of instances, so that notwithstanding the desperate situation of those afflicted with cancer, even the surgeons who had themselves seen the most astonishing effects produced upon the course of this otherwise incurable disease were no longer willing to assume the responsibility involved by resorting to such a dangerous procedure.

The efforts to make use of the principle of this sole effective „internal“ treatment of cancer were, however, not completely discouraged by the dangerous complication due to the inoculation of the living organisms.

- 1) Pitha-Billroth, Bd. 1, Abt. 2.
- 2) Berl. klin. Wochenschr., 1866, No. 23.
- 3) Berl. klin. Wochenschr., 1868, No. 12.

The logical alternative of direct infection with streptococcus was naturally the injection of its toxins, free from the living bacteria, in such quantities as would produce, if necessary, all the outward symptoms of the infection, without endangering the life of the individual.

Coley<sup>1)</sup>, in his experience with the mixed toxins of streptococcus and prodigious covering a period of about twenty years, has collected a large series of cases of sarcoma, in which injections of the toxins were followed by great diminution in the size of the tumors or even complete disappearance and permanent cure. He also states<sup>2)</sup> that whereas in untreated cases recurrence takes place in 75% after operation, when the toxins are used after operation recurrence follows in only 25%. The curative influence of Coley's mixed toxins upon malignant growths has been reported also by Czerny<sup>3)</sup> and others.

The relative efficacy of the toxins in the treatment of sarcoma and of epithelial cancers, according to Coley, corresponds with the general experience regarding the similar influence of streptococcus infections, namely, that sarcoma yields more often and more completely to treatment than does carcinoma.

The foregoing review of the published experiences relating to the influence of streptococcic infection upon malignant growths, makes it seem not merely possible but altogether probable that the same influence was operative in producing the retrogression of the tumors in the four infected cases Nos. 17, 18, 19 and 26. This assumption is greatly strengthened by the fact that among all the large numbers of cases who received similar injections without becoming infected, there were only two in whom the tumors apparently underwent a reduction in size.

The two cases just referred to are Nos. 8 and 36. It will be necessary to preface the discussion of these cases with a brief consideration of the question of tumor cachexia.

Tumor cachexia is the name applied to a symptom-complex, which is often seen in the course of malignant disease, consisting chiefly of loss of weight and strength, loss of appetite and an anaemic pallor, associated with more or less fever of hectic type without preceding chill. There is also oligocythemia and oligochromemia.

1) *Annals of Surgery*, 1891; *Amer. Journ. Med. Sc.*, 1896, Sept.; *Transactions of the New Hampshire Med. Soc.*, 1910 and elsewhere.

2) *Journ. of Amer. Med. Assoc.*, Jan. 1910.

3) *Münch. med. Wochenschr.*, 1895.

The question as to the cause of the cachexia of malignant tumors is inseparable from the question as to the actual existence of a specific cancerous cachexia, since the symptoms of this condition have been attributed to non-specific influences such as infection, pain and disturbance of digestion.

It cannot be denied that similar symptoms may be produced by localized infection of long standing, continued severe pain and mechanical disturbance of the digestive functions; but these conditions may also exist, in lesser degree, without giving rise to the clinical picture of cancer cachexia, and on the other hand, may be absent entirely or present in very limited extent in some cases of pronounced tumor cachexia.

An important objective symptom of tumor cachexia, which is presented by some cancer patients, is the loss of body nitrogen demonstrated by Fr. Müller, Klemperer and Gertig. The destruction of body proteid in these cases is conceived by v. Dungern and Werner to be due to the absorption of toxic substances produced by the action of bacteria upon the tumor tissue. The severe cachexia of some cases of early carcinoma of the stomach does not seem to be amenable to this explanation.

Undoubtedly the symptoms of tumor cachexia are often exaggerated by a concomitant infection, or the mechanical disturbance of digestive functions, but, although it has not been possible to prove the existence of a specific tumor cachexia, we do not believe that the efforts to explain away this condition, as always due to an accidental complication of cancer, have been successful.

For the "true" tumor cachexia a number of causes have been suggested. Most of the explanations have assumed a direct toxic influence upon the body by products of the cancer tissue or of a hypothetical cancer parasite. But, as Coca and Gilman remark, if a direct toxic influence were exerted by substances derived from the tumor, the injection into the same individual of a large quantity of the tumor tissue should be expected to cause an exaggeration of the symptoms. The result of such injections, however, has been just the reverse of this. Not only has the introduction of large amounts of malignant tissue into cancer patients not produced symptoms

of cachexia in cases where such a condition was wanting, but has been followed in every case in which cachexia was present, by a rapid disappearance of the symptoms.

Blumenthal<sup>1)</sup> thought he could demonstrate in malignant tissue ferments which were able to digest heterologous tissue more powerfully than could the ferments of normal tissue. Upon the basis of this observation, supported by the similar independant study of Neuberg<sup>2)</sup>. Blumenthal built up a theory of tumor malignancy as well as of tumor cachexia, which further assumed that the cancer ferments were capable, also, of digesting the living normal organ cells to which they had been carried through the blood stream. Neuberg also applied the results of his own investigations to the explanation of cancer cachexia. The later studies of Hess and Saxl<sup>3)</sup> and of Kepinow<sup>4)</sup> indicated that the conclusions of Blumenthal and of Neuberg were based upon fallacious experiments, although Blumenthal, Jacoby and Neuberg<sup>5)</sup> have more recently confirmed the original observations of Neuberg and Blumenthal.

However, if the existence of heterolytic ferments in cancer tissue should be definitely proven, it could not be immediately assumed that these ferments could injure the living cells of the organs to which they might be carried, and the experimental demonstration of any such action would be surrounded with insuperable technical difficulties.

The experiments of Abderhalden and his associates<sup>6)</sup> do not add directly any information upon the question of heterolytic ferments in cancer tissue. Whether the ferment action

---

1) Blumenthal und Wolff, *Med. Klin.*, 1905, No. 7.

2) *Berl. klin. Wochenschr.*, 1905, No. 5.

3) *Wien. klin. Wochenschr.*, 1908.

4) *Zeitschr. f. Krebsf.*, Bd. 7, 1909.

5) *Med. Klin.*, 1909, No. 42.

6) Abderhalden und Rona, *Zeitschr. f. physiol. Chemie*, Bd. 60, 1909; Abderhalden, Koelker und Medigreceanu, *ebenda*, Bd. 62, 1909; Abderhalden und Medigreceanu, *ebenda*, Bd. 62, 1910; Abderhalden und Pincussohn, *ebenda*, Bd. 66, 1910; Abderhalden, *Zeitschr. f. Krebsf.*, Bd. 9, 1910.



observed by the writers in the juice of cancer tissue is different from that which would be exerted by the juice of the epithelial structures from which the respective tumors were derived, cannot be determined with certainty from their protocols.

Another theory of cancer cachexia is that advanced in the preliminary report of Coca and Gilman upon the subject of the present article. According to this theory, the condition of cachexia is one of anaphylactic intoxication, being due to the continuous absorption of the specific epithelial substances of the malignant tumor after the establishment, by such absorption, of a state of hypersensitiveness to those substances.

The experimental grounds of this theory are as follows:

1. The symptoms of tumor cachexia can be reproduced in anaphylactic animals by continued introduction of minute quantities<sup>1)</sup> of the antigen.

2. Anaphylactic antibodies have apparently been found by H. Pfeiffer and the condition of hypersensitiveness to cancer extracts has been demonstrated by Gorowitz<sup>2)</sup> under v. Dungern's direction, in cancer patients.

3. The injection of large quantities of cancer tissue causes the disappearance of the symptoms in cachectic cancer patients. This effect can be considered as corresponding with the establishment in anaphylactic animals, of the condition of anti-anaphylaxis by the injection of relatively large but sub-lethal amounts of the antigen.

To the category of the symptoms of tumor cachexia given above, should be added those of local inflammation. We believe in other words, that local pain and the other evidences of inflammatory reaction are not always to be looked upon as possible causes of the cachectic state but rather as a frequent expression of its existence. In accordance with the conception

---

1) The recent experiments of Friedberger upon the pyrogenic effect of repeated injections of the antigen in minute quantities, sufficiently explain the nature of the hectic fever of cancer patients.

2) *Centralbl. f. Bakt. etc. I. Abt., Ref. Beilage, Bd. 44, 1907, p. 57.*

of tumor cachexia as a condition of true autointoxication due to the continuous absorption by the sensitized individual of specific epithelial substances, local pain and inflammation need not always be caused by infection or the mechanical influence of the tumor mass, but may be the expression of a local allergic reaction.

The experiences of Tuffier<sup>1)</sup> in the treatment of malignant tumors with non-specific sera as well as those of J. W. Vaughan<sup>2)</sup> in the use of the "non-toxic residue" of malignant tissue in the treatment of cancer, are in harmony with the anaphylactic theory of tumor cachexia. Tuffier stated that he had seen a considerable temporary reduction in the size of malignant tumors and an improvement in the general health of tumor patients as the result of injections of various anti-toxic sera, such as the ordinary diphtheria antitoxin<sup>3)</sup>. Tuffier suggested that the reduction in the size of the tumors might be due to the phagocytic action of the leucocytes, which are greatly increased in the peripheral circulation after the serum injections.

The data obtainable from Tuffier's communications do not permit of any judgment as to whether the tumors observed by him diminished in size as the result of a loss of malignant tissue, or whether the reduction in the size of the tumors was due to the absorption of an inflammatory exudate. However, this may have been, the transient disappearance of the local and general cachectic symptoms can be explained as the expression of a state of anti-anaphylaxis; for it is known that sensitized animals can be rendered anti-anaphylactic not only by the reinjection of a suitable quantity of the specific antigen but sometimes, also, by the injection of other proteids<sup>4)</sup>, including even commercial "peptone".

Vaughan treated tumor patients presenting symptoms of cachexia with injections of the "non-toxic residue" of can-

1) Presse méd., 1904, No. 10, p. 73. Presse méd., 1905, No. 4, p. 27.

2) Journ. Mich. Med. Soc., Vol. 4, p. 593.

3) Loeffler had recorded similar results following injections of the serum of asses that had been "immunized" with injections of tumor tissues.

4) H. Pfeiffer and S. Mita, Zeitschr. f. Immunitätsforsch., Bd. 4, 1910, p. 410. See also Calvary, Münch. med. Wochenschr., 1911, No. 27.

cerous tissue, which he prepared by warming the tissue with a 2% solution of NaOH in absolute alcohol — the insoluble portion representing the "non-toxic residue" — and reported the disappearance of the symptoms, general and local, in a series of cases.

Pain in cancer, therefore, we conceive as being due either to actual involvement of nerve trunks by the tumor, or to infection, or finally to the local anaphylactic reaction which we have just considered.

In both of the cases 8 and 36 there was local inflammatory reaction. In No. 8 pain was not a prominent symptom, but ulceration had begun. No other symptoms of cachexia were presented by this case. In case 36 both the local inflammatory reaction and the general symptom of cachexia were present in extraordinary degree; there was, however, no ulceration.

Shortly after the first injections in both instances the local inflammatory processes subsided, and coincidentally, the tumor nodules diminished in size — perceptibly in No. 8, remarkably in No. 36. Under the circumstances, however, we are by no means justified in believing that the reduction in the size of the tumors was due to any destruction and absorption of the proper tumor cells. It is indeed probable that the change in size was the result of the absorption of the inflammatory exudate, which took place upon the removal of the causes of the inflammation.

In our experience, therefore, with the "vaccination treatment" in malignant tumors we are not able to record a single instance in which the retrogression of the tumors could be ascribed to a destruction of the tumor cells as the result of a process of immunization.

The inefficacy of the injection of large quantities of fresh tumor tissue as an immunizing procedure in malignant disease is still more strikingly seen in the failure of such injections to prevent a recurrence of the disease even where

the treatment was given after complete excision of the growth. In 52 percent of the cases treated under these favorable circumstances — group 1 — recurrence took place within  $1\frac{1}{2}$  years.

Coca and Gilman<sup>1)</sup> reported the rapid disappearance of general cachectic symptoms after the injection of the tumor tissue. We have had a similar experience. In every case in which there was general cachectic symptoms these have subsided or disappeared completely within three days after the injections. Such cases were Nos. 6, 31 and 36. The local symptoms of cachexia — pain and swelling — which were marked in cases 8, 13, 15, 31, 36, 51, 99 and H13, disappeared also in every instance within 48 hours after the injections. In two cases, Nos. 15 and 31, this influence was wanting after the first injection but followed the second injection. In one of these cases — No. 31 — the first injection was small.

In cases Nos. 7, 20 and 99, there was referred pain due to involvement of nerve trunks. In none of these was this pain relieved by the injections.

In only one instance, case 14, was any inflammatory reaction in the tumor itself seen to follow the injections.

Except for the rapid relief of cachectic symptoms we have seen no evidence of any specific influence upon the malignant growths by the injection of tumor tissue. Our investigation leaves us, therefore, without any explanation for the results of the "vaccination" treatment seen in the case of Le Bertrand and in the two cases of Coca and Gilman, which we have described in this article. The case of Le Bertrand as well as one of our own (Jose Composano) may have represented a coincident spontaneous retrogression but the remarkable changes seen in the first Manila case (Valentin Noguera) can scarcely be explained in this way.

The constant favorable influence of injections of large quantities of cancer tissue upon the cachectic symptoms in malignant disease, constitutes the single indication, according to our experience, for the use of such injections as a therapeutic measure.

---

1) l. c.

The recent experiences of Beebe<sup>1)</sup> in New York add strong support to this conclusion.

Infection can be avoided by the use of formaldehyde, which in a concentration of 1:1000 will sterilize a fine tumor emulsion within 24—36 hours. That this disinfectant does not destroy the anti-cachectic influence of the material is amply shown in case 36.

The greatest danger in the use of fresh tumor emulsions, barring the one of causing infection, is that of reimplanting the tumor. This contingency was considered by Coca and Gilman, but in view of the thorough crushing to which the tumor tissue is subjected in being passed ten times through a Baird and Tatlock vaccine machine, the risk was thought to be a slight one. Moreover, the addition of 0.5% of carbolic acid was believed to be sufficient to render incapable of growth the few cells which might have escaped mechanical destruction.

Gilman later introduced a modification of the method of preparation, which consisted in a simple forcing of the tumor cells through fine wire gauze, instead of grinding the tissue. After the introduction of this modification, reimplantations occurred in four cases receiving injections of tumor cell emulsions prepared in that way. In every case the tumor from which the emulsion was made had been removed from the individual receiving the injection and the emulsion had stood in at least three instances with 0.5% carbolic acid for 24 hours. The history of three of these cases was reported by W. B. Coffey<sup>2)</sup>.

Of our own series, 29 individuals received injections of ground tumor cells prepared from their own tumors, without the addition of any antiseptic, and 25 received similar injections of heterologous material. Among all these one alone suffered a reimplantation at the site of injection of an autogenous preparation. The emulsion used in this case had been ground in an old and defective machine which was soon afterward repaired.

1) Oral Communication.

2) Calif. State Journ. of Med., March 1911.

These untoward experiences supply further evidence of the great similarity between the malignant tumors of Man and those of the lower animals. While it is true that none of the transplantations was made into an individual other than the one in whom it had originated, the possibility of such a transplantation is not excluded by the negative results thus far recorded; because in the great majority of instances the material injected to a treatment which was most unfavorable to the further development of the tumor cells.

Our observations seem strongly to show that the active immunization against malignant tumors in human beings is impracticable. We believe that cancer is a medically curable disease; that is, that it is amenable to cure by "internal" treatment. This is strongly indicated not only by the results obtained by the use of bacterial toxins in the hands of Coley, and the foetus autolysates in the hands of Fichera<sup>1)</sup>, as well as by our own experience in the case of Valentín Noguera, but also by the considerable number of recorded instances of spontaneous retrogression of malignant tumors in human beings.

---

Our sincere thanks are due Dr. Juan Guiteras, director of the Department of Sanitation of Cuba, for his generous support of our studies in Havana.

### Zusammenfassung.

1) In den Tropen kommt Infektion mit Streptococcus pyogenes relativ selten vor.

2) Es gelingt nicht mittels der Methoden der Komplementablenkung und der spezifischen Präzipitation im Blute Krebskranker, die eine Woche vorher Injektionen ihrer eigenen Tumoren erhalten haben, spezifische Antikörper nachzuweisen.

3) Die Analyse von 79 Fällen maligner Tumoren, die mit Injektionen großer Mengen des Tumorgewebes behandelt

---

1) Fichera, Policlinico, Roma, Vol. 17., No. 27, p. 835; Lancet, London 1911, Oct. 28th; and elsewhere.

waren, zeigt nicht die geringste Beeinflussung der Krankheit, die auf eine aktive Immunisierung bezogen werden könnte.

4) Die zufällige Infektion mit *Streptococcus pyogenes* hatte in vier Fällen von Carcinom eine rapide Vernichtung und Absorption der Geschwülste zur Folge, ohne jedoch dadurch eine dauernde Heilung herbeizuführen.

5) Weitere Stützen für die Krebskachexie-Theorie von Coca und Gilman werden gebracht. In jedem Falle, wo Symptome der Kachexie vorhanden waren, schwanden diese kurz nach der Injektion des Tumorgewebes.

---

*Nachdruck verboten.*

**Bemerkungen zu der Arbeit von Graetz:  
„Experimentelle Studien zur Theorie und Praxis  
der Eiweißdifferenzierung“.**

Von L. Haendel.

(Eingegangen bei der Redaktion am 22. Mai 1912.)

In einer in Bd. 13, Heft 4 dieser Zeitschrift erschienenen Arbeit: „Experimentelle Studien zur Theorie und Praxis der Eiweißdifferenzierung“, unterzieht Graetz eine frühere, in Bd. 7, Heft 3 veröffentlichte Mitteilung: „Auswertung von Anti-eiweißseris“ von Steffenhagen und mir einer in polemischer Form gehaltenen Kritik, die mir zu einigen sachlichen Bemerkungen Anlaß gibt.

Graetz bestätigt zwar in seiner Arbeit die damals von Steffenhagen und mir erhobenen Befunde, wonach Anti-Eiweißsera trotz hohen Präzipitingehaltes nur eine geringe komplementbindende Wirkung entfalten können, vollkommen, behauptet jedoch, daß im Gegensatz zu unseren Angaben derartige Sera nur selten vorkommen. Wie viele solcher Sera von Graetz selbst beobachtet worden sind, ist aus seinen Ausführungen nicht genau ersichtlich. Wir fanden jedenfalls, als wir vor 2 Jahren unsere Versuche aufnahmen und einen Teil der uns zu jener Zeit zur Verfügung stehenden prä-

zipitierenden Sera in dieser Hinsicht untersuchten, unter diesen sofort 17 schlecht komplementbindende Sera mit hohem Präzipitingehalte, welche wir dann in vergleichenden Untersuchungen systematisch bezüglich ihrer präzipitierenden und komplementbindenden Wirkung, zum Teil auch hinsichtlich ihrer anaphylaktisierenden Eigenschaften und nach ihrer Präzipitationsstärke nach Nuttall ausgewertet haben. Obwohl ich späterhin besondere Untersuchungen nach dieser Richtung nicht weiter vorgenommen habe, sind mir doch gelegentlich anderer Versuche auch in der Zwischenzeit nicht selten ebenfalls wieder Sera vorgekommen, welche ein gleiches Verhalten zeigten. Auch an anderen Stellen sind entsprechende Beobachtungen gemacht worden. Ich verweise hier nur auf die Angabe in der kürzlich erschienenen Arbeit von Seiffert (Zeitschr. f. Hygiene, Bd. 71, p. 547): „Bei Verwendung der Sera zur Komplementbindung ist zu berücksichtigen, daß nicht alle Sera einen hohen komplementbindenden Titer (oft gar keinen)<sup>1)</sup> besitzen, wie dies auch schon Haendel und Steffenhagen festgestellt haben.“

Man wird also auch den Ausführungen von Graetz gegenüber daran festhalten müssen, daß unsere damalige Feststellung, wonach „empfindliche, präzipitierende Sera mit nur geringer komplementbindender Wirkung anscheinend sogar verhältnismäßig häufig vorkommen, häufiger jedenfalls als man bisher anzunehmen geneigt war“, vollkommen zu Recht besteht. An sich kommt meines Erachtens aber dieser von Graetz in den Vordergrund gerückten Frage, ob solche Sera häufig oder selten vorkommen, nur eine sekundäre Bedeutung zu. Als wir damals unsere Befunde veröffentlichten, erschien es uns aus dem Grunde notwendig, überhaupt auf diese Erscheinung ausdrücklich aufmerksam zu machen, weil zu jener Zeit über entsprechende Beobachtungen noch kaum etwas bekannt geworden war, und in weiten Kreisen der Fachgenossen die Auffassung bestand, daß ein Parallelismus im Ausfall der Präzipitation und Komplementbindung in jedem Falle bestehen und jedes präzipitierende Serum auch

---

1) Im Original nicht gesperrt gedruckt.



Komplementbindung bewirken müsse. Wurde von einem Untersucher eine gegenteilige Beobachtung gemacht, so hatte dies dann, wie wir aus manchen persönlichen Anfragen ersahen, die Folge, daß in solchen Fällen Zweifel und Unsicherheit bezüglich der Zuverlässigkeit beider Methoden entstanden. Um in dieser Hinsicht Aufklärung zu schaffen, hatten wir unsere Befunde mitgeteilt.

Wenn Graetz nun eine Reihe von Sera anführt, welche größtenteils eine erheblich stärkere komplementbindende als präzipitierende Wirkung entfalten, so bringt eine derartige Zusammenstellung nichts Neues und widerlegt unsere Angaben in keiner Weise.

Daß auch präzipitierende Sera mit einer weitergehenden komplementbindenden Kraft vorkommen, ist eine allbekannte Sache und von niemanden, insbesondere auch von uns nicht, bestritten worden. Wohl aber wurde von uns betont, daß diese Eigenschaft nicht bei jedem präzipitierenden Serum, wie dies damals vielfach geschah, ohne weiteres vorausgesetzt werden darf, sondern daß auch verhältnismäßig nicht selten bei präzipitierenden Seris das umgekehrte Verhalten zu beobachten ist. Aus diesem Grunde haben wir dann auch die schon von Sachs gestellte Forderung erneut hervorgehoben, auch für den Komplementbindungsversuch nur sorgfältig in dieser Hinsicht ausgewertete Sera zu verwenden. Dieser Forderung schließt sich ja auch Graetz im allgemeinen an. Allerdings glaube ich gegenüber der betreffenden Angabe von Graetz, daß es sich nicht nur empfiehlt, dieser Forderung zu entsprechen, sondern, daß deren Erfüllung unbedingt notwendig ist. Daß bei Beachtung dieser Forderung das Vorkommen eines schlechten Bindungsvermögens bei hochwertigen präzipitierenden Antiseris keine Kontraindikation gegen die praktische Verwertung des Komplementbindungsverfahrens als solches für die Antigendiagnose in foro bildet, erscheint mir selbstverständlich. Dagegen kann meines Erachtens nicht eindringlich genug davor gewarnt werden, etwa in der Praxis für Komplementbindungsversuche Antisera mit mangelndem oder geringem Bindungsvermögen zu verwenden, nachdem sie nach Graetz durch „technische

Kunstgriffe“, Entfernung der Ambozeptoren oder durch Verwendung gut ablenkbarer Komplementsera in der von Graetz beschriebenen Weise für den Komplementbindungsversuch geeignet gemacht worden sind. Die von Graetz für derartige Sera mitgeteilten Protokolle zeigen deutlich, daß solche Antisera, welche gleichzeitig in einem Falle einen ausgesprochen positiven, im anderen einen völlig negativen Reaktionsausfall bewirken können, für forensische Untersuchungen jedenfalls vollkommen unbrauchbar sind.

Nur bei Benutzung einwandfreier, genau ausgewerteter Sera wird das Neisser-Sachssche Komplementbindungsverfahren für forensische Zwecke verwendet werden dürfen, wie dies ja auch für die Präzipitinmethode von Uhlenhuth gefordert wird. Es wird dann in Ergänzung des Uhlenhuthschen Verfahrens in besonderen Fällen, speziell bei der Untersuchung gekochter Würste, gute Dienste leisten können, wie dies Uhlenhuth selbst immer hervorgehoben hat. Im übrigen wird aber grundsätzlich ebenfalls an der Uhlenhuthschen Forderung festzuhalten sein, daß in erster Linie der Ausfall der Präzipitinmethode bei der forensischen Untersuchung ausschlaggebend bleiben muß, und daß auf den alleinigen positiven Ausfall einer Komplementbindungsreaktion ein entscheidendes Urteil in der Praxis nicht zulässig ist.

*Nachdruck verboten.*

[Aus dem Institut für allgemeine und experimentelle Pathologie  
der Jagellonischen Universität in Krakau.]

**Ueber den Einfluß der Radium-Emanation auf die Phago-  
cytose von Bakterien.**

Von Prof. Dr. Carl v. Klecki.

(Eingegangen bei der Redaktion am 24. März 1912.)

Seitdem man die Heilerfolge, welche mit gewissen Wasserkuren, nämlich durch den Gebrauch von Akrothermen, erzielt werden, hauptsächlich der in denselben enthaltenen Radium-Emanation zuschreibt, ist eine große Anzahl von Publikationen über die therapeutische Wirkung der Radium-Emanation erschienen. Die physiologischen Grundlagen aber, auf welches eine jede rationelle Therapie sich stützen sollte, sind hier jedoch noch ziemlich unbearbeitet geblieben.

Die bisherigen diesbezüglichen Untersuchungen haben erwiesen, daß die Radium-Emanation, wenigstens unter gewissen Umständen, sowohl auf höhere tierische Zellen, wie auch auf niedere Wesen eine Wirkung ausübt.

Es erhellt aus den Versuchen von Bouchard, R. Curie und Balthazard, daß die Radium-Emanation, welche im allgemeinen keine ausgesprochenen toxischen Eigenschaften besitzt, unter Umständen höhere Tiere vergiften, sogar den Tod derselben durch Vergiftung herbeiführen kann. Die Wirkung der Radium-Emanation auf in Entwicklung stehende Organismen ist aus den Untersuchungen von Danysz, Szaper und Winterbert ersichtlich. Nach Löwenthal beruht die Wirkung der Radium-Emanation auf den Organismus auf Aktivierung der durch die Zellen desselben produzierten Fermente.

Die unmittelbare Einwirkung der Radium-Emanation auf rote Blutkörperchen und Spermatozoen ruft nach London eine Auflösung derselben hervor.

Bouchard, P. Curie und Balthazard haben in ihren oben angegebenen Versuchen gefunden, daß bei Tieren, welche mit Radium-Emanation vergiftet sind, Leukopenie auftritt; es kann daraus gefolgert werden, daß die Radium-Emanation entweder auf die weißen Blutkörperchen negativ chemotaktisch einwirkt, oder gar durch Vernichtung dieselben im Blute zum Schwunde bringt.

Was die Wirkung der Radium-Emanation auf Bakterien anbetrifft, so haben v. Baeyer, London, Dorn, Baumann und Valentiner, Goldberg, Dautwitz und Rheinboldt festgestellt, daß dieselbe sowohl für Saprophyten wie auch für pathogene Bakterien, wie Anthrax, Typhus, Diphtheriebacillen und Choleravibrionen bakterizid ist; nur Löwenthal spricht der Radium-Emanation eine jede bakterizide Wirkung ab. Bouchard und Balthazard haben die schädliche Wirkung der Radium-Emanation auf Farbstoff bildende Bakterien eingehend beschrieben, wobei sie auf Differenzen dieser Wirkung auf verschiedene Gruppen der genannten Mikroorganismen hinweisen. Folglich ist die Wirkung der Radium-Emanation auf verschiedene Mikroben nicht immer die gleiche. Nach Suess beeinträchtigt die Radium-Emanation weder die Entwicklung noch die pathogenen Eigenschaften der verschiedenen Typen des Tuberkelbacillus.

Aus obiger Zusammenstellung ist es ersichtlich, wie spärlich unsere Kenntnisse über den Einfluß der Radium-Emanation auf das Zellleben sind. Indem die Phagocytose einen Ausdruck der Zelltätigkeit darstellt, welcher leichter als viele andere Phänomene des Zelllebens eingehend studiert werden kann und in Anbetracht der wichtigen Rolle, welche der Phagocytose im allgemeinen, speziell aber der Phagocytose von Bakterien in pathologischen Verhältnissen zukommt, habe ich diese Frage einer experimentellen Prüfung unterworfen, um so mehr als man auf Grund der bisherigen Untersuchungen über die physiologische Wirkung der Radium-Emanation sich kein Urteil über den Einfluß derselben auf das in Rede stehende Phänomen bilden konnte.

Diese Untersuchung habe ich schon im Jahre 1909 begonnen und ich war schon in demselben Jahre 1909 in der Lage, über einige Resultate dieser Arbeit auf dem I. Kongreß polnischer Internisten in Krakau zu berichten. Weitere im Laufe des Jahres 1910 durchgeführte Experimente haben die früher erhaltenen Resultate vollkommen bestätigt und haben es mir gestattet, den Mechanismus der beobachteten Phänomene etwas näher zu erläutern.

In demselben Jahre 1910 ist eine Arbeit von Reiter über den Einfluß der Radium-Emanation auf die Phagocytose des Tuberkelbacillus erschienen. Aus seinen im vitro durchgeführten Experimenten folgert Reiter, daß die Radium-Emanation im allgemeinen die Phagocytose des Tuberkelbacillus anzuregen scheint, in einzelnen Fällen bis zu 30 Proz., daß aber unter Umständen (unter welchen wird nicht angegeben) die Emanation durch direkte Einwirkung auf die Bakterien dieselben vor der Phagocytose schützen zu

können scheint. Den die Phagocytose des Tuberkelbacillus verstärkenden Einfluß der Radium-Emanation glaubt Reiter auf die Anregung der Tätigkeit der Phagocyten zurückführen zu dürfen. In vivo an Meer-schweinchen von Reiter angestellte Versuche haben keine Resultate ergeben, was Reiter der prompten Ausscheidung der Radium-Emanation aus dem tierischen Körper zuschreibt.

Es soll an dieser Stelle nur angedeutet werden, daß die Resultate meiner analogen mit dem Tuberkelbacillus angestellten Experimente mit den von Reiter erhaltenen Resultaten in Widerspruch stehen.

\*       \*       \*

Den Einfluß der Radium-Emanation auf die Phagocytose von Bakterien habe ich in einem Apparate studiert, welcher speziell zu diesem Zwecke zusammengestellt wurde.

Die Phagocyten wurden aus der Pleurahöhle von Kaninchen erhalten, nach Einspritzung in dieselbe am Vortage des Experiments von 6—10 ccm einer Aleuronatemulsion in physiologischer Kochsalzlösung im Verhältnis von 3:40. Die aus der Pleurahöhle gewonnenen Zellen wurden mit einer 0,2 Proz. zitronsaures Natrium enthaltenden physiologischen Kochsalzlösung mehrmals gründlich gewaschen. Eine solche Lösung eignet sich nach Hekma besonders gut für Untersuchungen über Phagocytose in vitro, was ich auf Grund meiner eigenen Erfahrung bestätigen kann. Nach vollendeter Waschung der Phagocyten mit dieser Lösung wurden dieselben in gewöhnliche Kochsalzlösung übertragen.

Die vorliegenden Experimente wurden mit 3 Bakterienarten angestellt: mit dem *Bacterium coli commune*, dem *Staphylococcus pyogenes aureus* und mit dem *Bacillus* der menschlichen Tuberkulose.

Eine Suspension der beiden erstgenannten Mikroben in physiologischer Kochsalzlösung wurde durch Schütteln der von 48-stündigen Agarkulturen abgeschabten Bakterienhäute mit Glasperlen erhalten, eine Suspension von Tuberkelbacillen resp. von Fragmenten derselben wurde durch Zerreiben der auf Glyzerinbouillon gebildeten Bakterienhäute mit sterilisiertem Sand in Kochsalzlösung gewonnen, und zwar benutzte ich anfangs bei der Anfertigung dieser Suspension 0,85-proz. Kochsalzlösung, später eine solche von 0,1 Proz., welche nach den Angaben von Wright und Douglas und von Bulloch die Tendenz des Tuberkelbacillus zur Häufchenbildung beeinträchtigen soll. In beiden Fällen ließ sich eine ziemlich gleichmäßige Suspension der Bacillen erhalten, was meines Erachtens mehr von einem genauen Zerreiben der Bakterienhäute als von der Konzentration der Kochsalzlösung abhängig ist.

Die in obiger Weise erhaltene Bakteriensuspension wurde den in physiologischer Kochsalzlösung suspendierten weißen Blutkörperchen beigemischt und nach Durchmischung derselben wurde je ein Tropfen dieser Mischung in die zentrale Aushöhlung von einigen, gewöhnlich von 10 Objektträgern gebracht. Indem in einem jeden Experiment ein Kontrollversuch ausgeführt wurde, wurden die Objektträger mit den an denselben hängenden Tropfen, gewöhnlich zu 5 Stück, in jedem Versuch auf entsprechenden Haltern, der eine über dem anderen, mit der nach unten gerichteten Aushöhlung in 2 gleiche Glasgefäße gebracht, deren jedes 100 ccm destillierten Wassers enthielt, wobei das Wasserniveau den untersten Objektträger nicht erreichte. Die Glasgefäße waren mit doppelt durchbohrten Kautschukpfropfen hermetisch verschlossen. Zwei in die Gefäße eingeführte Glasröhren dienten zur Durchströmung des Inneren derselben mit Luft, resp. mit Radium-Emanation. Die beiden Glasgefäße wurden in einen auf 37° eingestellten Thermostaten gebracht.

Zwei durch eine Seitenöffnung im Thermostaten geführte Kautschukröhren dienten zur Durchleitung in das Innere der Glasgefäße von Gas aus zwei Erlenmeyerschen Kolben, welche neben dem Thermostaten aufgestellt waren und deren einer 250 ccm. destillierten Wassers und der zweite ebensoviel einer wäßrigen Lösung von ca. 2 mg Radiumbromid enthielten. Diese Radiumlösung wurde mir gütigst von Prof. August Wilkowski zur Verfügung gestellt. Die im Thermostaten aufgestellten Glasgefäße waren vermittelt einer Y-förmigen Glasröhre mit einer Wasserpumpe verbunden. Vermittels Klemmen, welche an den die verschiedenen Teile des Apparates verbindenden Kautschukröhren angebracht waren, konnte man einen jeden derselben, resp. die Atmosphäre des Inneren eines jeden Teiles des Apparates genau isolieren. Der Durchmesser aller analogen Glas- und Kautschukröhren war in beiden Hälften des Apparates der gleiche.

Durch die Wirkung der Wasserpumpe konnte somit nach Eröffnen der Klemmen durch das Innere der beiden die Tropfen der Mischung von Phagocyten und Bakterien enthaltenden Glasgefäße gleichzeitig ein Luftstrom von gleicher Stärke, gleicher Temperatur und gleicher Feuchtigkeit geleitet werden, welcher in der einen Hälfte des Apparates Radium-Emanation enthielt. Dieselbe löste sich zum Teil in dem in dem Glasgefäße enthaltenen Wasser auf bei ihrem Durchgang durch dasselbe mit den Luftblasen und gelangte später aus dem Wasser in die die Tropfen der Mischung der Phagocyten und Bakterien umgebende Atmosphäre, zum Teil gelangte sie dorthin direkt mit den auf der Oberfläche des Wassers platzenden Luftblasen.

Wie gesagt, waren die in den Glasgefäßen aufgestellten Objektträger mit den an der zentralen Aushöhlung der-

selben hängenden, Phagocyten und Mikroben enthaltenden Flüssigkeitstropfen nach unten gerichtet. Bei dieser Einrichtung waren die beiden in diesen Tropfen befindlichen, bei der Phagocytose beteiligten Elemente der Wirkung des Luftstroms resp. der Radium-Emanation gut ausgesetzt. Es war dabei erwünscht, daß die Sättigung der obige Flüssigkeitstropfen umgebenden Atmosphäre mit Radium-Emanation in den vorliegenden Experimenten bekannt und in analogen Versuchen ungefähr gleich sei. Indem es aus technischen Gründen nicht möglich war, die Radium-Emanation hier in der die Flüssigkeitstropfen umgebenden Luft zu bestimmen, wurde der Gehalt an Emanation des in dem Glasgefäß enthaltenen Wassers bestimmt, durch welches die Radium-Emanation mit dem Luftstrom geleitet worden war und aus welchem es in die Atmosphäre des Inneren der Gefäße gelangte. Diese Bestimmungen wurden mit dem Fontaktoskop von Engler und Sieveking vorgenommen. Es hat sich gezeigt, daß nach einer einstündigen Durchströmung des in dem Glasgefäß befindlichen Wassers mit dem Radium-Emanation führenden Luftstrom mit der Geschwindigkeit von 60—100 Gasblasen im Laufe einer Minute, das Wasser ca. 1 000 000 Emanationseinheiten<sup>1)</sup> in 1 Liter enthielt und daß das Wasser ungefähr denselben Gehalt an Radium-Emanation aufwies, wenn die Durchströmung desselben nur 10—15 Minuten gedauert hatte, selbst in dem Falle, wenn die Emanationsbestimmungen resp. Experimente, bei welchen die Radium-Emanation immer aus derselben Quelle stammte, alltäglich, und zwar einmal täglich, ausgeführt wurden. Die Sättigung mit Radium-Emanation des in dem Glasgefäß enthaltenen Wassers war demnach eine verhältnismäßig große, sie entsprach ungefähr derjenigen, welche das von den zu Trink- und Badekuren gebrauchten Emanatoren gelieferte Wasser bietet.

Es wurde also in den vorliegenden Versuchen das Innere der die Objektträger enthaltenden Gefäße mit emanationshaltiger resp. mit reiner Luft 10—15 Minuten lang durchströmt, worauf nach Abschluß der Gefäße dieselben noch 30

---

1) Zahl des Voltabfalls des Potentials nach Ablauf einer Stunde.

bis 45 Minuten lang in dem Thermostaten stehen gelassen wurden. Diese Zeit genügt nämlich vollkommen für die Ausbildung einer ausgesprochenen Phagocytose. Dann wurden die Gefäße geöffnet und mikroskopische Präparate von den Flüssigkeitstropfen, in welchen die Phagocytose vor sich ging, in entsprechender Weise angefertigt; die in einem jeden Experiment von beiden Flüssigkeiten in identischer Weise angefertigten Präparate wurden sofort nach Anfertigung derselben, gewöhnlich im Laufe eines und desselben Tages, untersucht.

Eine genaue Bestimmung der Intensität der Phagocytose von Bakterien durch Phagocyten, welche aus einer Körperhöhle künstlich erhalten worden sind, ist keine leichte Aufgabe. Nach der für Blutuntersuchungen von Wright ausgearbeiteten Methodik genügt es, die Zahl der im Plasma von 20 Phagocyten enthaltenen Bakterien zu bestimmen. Sauerbeck hebt aber mit Recht hervor, daß eine in obiger Weise ausgeführte Bestimmung des opsonischen Index infolge der Ungleichmäßigkeit, mit welcher sogar nebeneinander liegende Blutkörperchen Bakterien aufnehmen, sowohl bei starker wie auch bei schwacher Phagocytose zu groben Fehlern führt; nach Sauerbeck ist bei einer derartigen Bestimmung eine Zählung der von 100 Phagocyten aufgenommenen Bakterien erforderlich, besonders wenn die Phagocytose ungleichmäßig ist, oder wenn die Blutkörperchen nicht gleichmäßig im Präparate verteilt liegen.

In den vorliegenden Untersuchungen wurde in einem jeden Versuche die Zahl der von 80—300, meistens von 200—240 Phagocyten aufgenommenen Bakterien bestimmt, und dies sowohl in der Flüssigkeit, welche der Radium-Emanation ausgesetzt war, wie auch in der Kontrollflüssigkeit. Es wurde nämlich die Zählung der Bakterien gewöhnlich in 10 Präparaten, in einem jeden Präparate in 20 Phagocyten, für jede Flüssigkeit ausgeführt. Dabei wurden noch folgende Umstände berücksichtigt. Es wurden zu diesen Zählungen solche Stellen in den Präparaten gewählt, wo die Phagocyten möglichst gleichmäßig in der Flüssigkeit verteilt und von freien Bakterien umgeben waren. Es wurden dabei nur solche Phagocyten in Betracht gezogen, welche ihrem Aeußeren nach als ganz normal bezeichnet werden konnten, was bei einer Untersuchung von aus einem Exsudat stammenden Elementen besonders wichtig erscheint. Eine gewisse Erleichterung der Untersuchung in dieser Hinsicht bildete in den vorliegenden



Versuchen der Umstand, daß die Phagocytose hier im allgemeinen ziemlich schwach war und daß die Zeitdauer, in welcher die Bakterienprodukte auf die Phagocyten einen schädlichen Einfluß ausüben konnten, recht kurz war, so daß eine nennenswerte Schädigung der Zellen durch die genannten Produkte hier kaum zustande kommen konnte. In den Versuchen, in welchen das *Bacterium coli* und der *Staphylococcus pyogenes* phagocytiert wurden, wurden bei den obigen Zählungen nur die polynukleären neutrophilen Leukocyten berücksichtigt, in den Versuchen, welche mit dem Tuberkelbacillus ausgeführt worden waren, sowohl die Mikrophagen wie auch die Makrophagen.

Nach Wright und Douglas spielen die Opsonine bei der Phagocytose von Bakterien eine so wichtige Rolle, daß ohne deren Einwirkung auf die Bakterien die Erscheinung überhaupt nicht zustande kommt. Sauerbeck äußert sich in einer ähnlichen Weise für den Fall der Phagocytose von Streptokokken. Dagegen kommt nach Sawtschenko, Barykin und Maikow die Phagocytose von Bakterien, Kohlenpartikeln und Karminkörnern durch von Warmblütern stammende Zellen in einer isotonischen Lösung auch ohne Opsonine zustande, nicht aber die Phagocytose von roten, besonders von fremdartigen Blutkörperchen.

Auf Grund meiner eigenen Beobachtung glaube ich behaupten zu dürfen, daß für die Phagocytose wenigstens gewisser Bakterienarten die Opsonine nicht unentbehrlich sind. In den vorliegenden Versuchen haben die Phagocyten das *Bacterium coli*, den *Staphylococcus pyogenes aureus*, den Tuberkelbacillus, wie auch Karminkörner auch dann aufgenommen, wenn die Zellen ganz gründlich gewaschen waren und das Medium der Phagocytose reine physiologische Kochsalzlösung bildete. In einer Reihe von Versuchen mit dem *Bacterium coli* und dem Tuberkelbacillus, in welchem ich zu der Mischung von Phagocyten und Bakterien in physiologischer Kochsalzlösung noch vor der Aussetzung derselben der Einwirkung der Radium-Emanation noch Blutserum hinzufügte, welches von demselben Tiere stammte, welches die Phagocyten geliefert hatte, und zwar in einer der Phagocytensuspension entsprechenden Menge, war die Phagocytose, wie dies vorauszusehen war, stärker als in der reinen physiologischen Kochsalzlösung. Aber auch in dem Falle, wo also keine

Opsonine in Wirkung treten konnten, war die Phagocytose genügend stark ausgesprochen, um die Einwirkung der Radium-Emanation auf diese Erscheinung deutlich hervortreten zu lassen.

\*       \*       \*

Von der Gesamtzahl von 28 Versuchen, welche ich in den vorliegenden Untersuchungen ausgeführt habe, wurde in 22 Versuchen die Phagocytose von Bakterien unter der Einwirkung der Radium-Emanation untersucht. 10 von diesen Versuchen wurden mit dem *Bacterium coli* angestellt; in allen diesen Versuchen wurden die Bakterien von den Phagocyten aufgenommen in einer Flüssigkeit, welche kein Blutserum enthielt und in 2 dieser Versuche außerdem noch in einer Serum enthaltenden Flüssigkeit. In 2 Versuchen wurde der *Staphylococcus pyogenes aureus* durch die Phagocyten in einem Medium ohne Serum aufgenommen. 10 Versuche endlich wurden mit dem Tuberkelbacillus ausgeführt, dessen Phagocytose in allen Versuchen in einem Medium ohne Serum und in 6 derselben ebenfalls in einem Serum enthaltenden Medium vor sich ging.

In den folgenden 2 Tabellen sind die Resultate der obigen 22 Versuche zusammengestellt. Man findet in denselben die Zahl der in einem jeden Versuche untersuchten Phagocyten, die Zahl der in denselben enthaltenen Bakterien, die Zahl der durch 100 Phagocyten aufgenommenen Bakterien und den phagocytären Index, welcher die Verstärkung resp. Abschwächung der Phagocytose unter dem Einfluß der Radium-Emanation im Vergleich mit der Intensität der in der entsprechenden Kontrollflüssigkeit vor sich gehenden Erscheinung anzeigt.

In den 2 letzten Versuchen mit dem *Bacterium coli* und in den 6 letzten Versuchen mit dem Tuberkulosebacillus werden sub a) die Zahlen angegeben, welche für den Fall erhalten worden sind, wenn das flüssige Medium der Phagocytose kein Blutserum enthielt und sub b) die analogen Zahlen für den Fall, wenn die genannte Flüssigkeit Blutserum enthielt.

## Versuche mit dem Bact. coli und dem Staph. pyog. aureus.

Bakterien-art	Ver-such	Unter dem Einfluß d. Rad.-Em.		In der Kontroll-flüssigkeit		Zahl der Bakterien in 100 Phagocyten		Phagocy-tärer Index
		Unter-suchte Phago-cyten	Ent-haltene Bak-terien	Unter-suchte Phago-cyten	Ent-haltene Bak-terien	Unter dem Einfluß der Rad.-Em.	In der Kontroll-flüssigkeit	
Bacterium coli commune	I	200	170	200	149	85	75	1,13
	II	160	143	160	106	89	77	1,16
	III	200	346	200	277	173	139	1,25
	IV	180	298	200	223	167	112	1,40
	V	180	145	200	130	81	65	1,24
	VI	100	55	100	50	55	50	1,10
	VII	300	227	280	146	76	52	1,47
	VIII	240	134	120	45	56	38	1,46
	IX a)	240	414	240	190	172	79	2,18
	b)	240	511	200	141	213	71	3,00
Staph. pyog. aur.	X a)	240	376	240	258	157	108	1,45
	b)	240	469	200	86	183	43	4,26
Staph. pyog. aur.	XI	160	89	120	59	56	49	1,14
	XII	180	401	200	313	223	157	1,42

## Versuche mit dem Tuberkelbacillus.

Versuch	Unter d. Einfluß der Rad.-Em.		In der Kontroll-flüssigkeit		Zahl der Bakterien in 100 Phagocyten		Phagocy-tärer Index
	Unter-suchte Phago-cyten	Ent-haltene Bak-terien	Unter-suchte Phago-cyten	Ent-haltene Bak-terien	Unter dem Einfluß der Rad.-Em.	In der Kontroll-flüssigkeit	
XIII	200	174	200	267	87	133	0,65
XIV	200	293	200	346	156	173	0,90
XV	200	148	200	191	74	95	0,78
XVI	200	187	200	277	94	138	0,68
XVII b)	180	327	180	321	182	178	1,02
XVIII a)	200	133	160	162	67	100	0,67
b)	240	257	240	396	107	165	0,65
XIX a)	200	178	160	186	89	116	0,77
b)	200	343	120	185	171	155	1,10
XX a)	240	453	240	722	189	301	0,63
b)	240	705	240	744	294	310	0,93
XXI a)	120	88	200	203	73	100	0,73
b)	240	260	80	174	108	217	0,50
XXII a)	120	79	240	154	66	64	1,03
b)	240	201	280	340	84	121	0,69

Aus obiger Zusammenstellung ist es ersichtlich, daß in allen Versuchen, in welchen das Bacterium coli und der Staphylococcus pyogenes aureus von den Phagocyten aufgenommen wurde, die Intensität der Phagocytose unter dem Einfluß der

Radium-Emanation zunahm, besonders in denjenigen Versuchen mit dem *Bacterium coli*, in welchen die Flüssigkeit, in welcher die Phagocytose vor sich ging, Blutserum enthielt. In 10 Versuchen mit dem *Bacterium coli*, in welchen das flüssige Medium der Phagocytose kein Serum enthielt, schwankte der phagocytäre Index unter dem Einfluß der Radium-Emanation zwischen 1,10 und 2,18 und betrug im Mittel 1,38, in 2 eben solchen Versuchen mit Serum betrug er 3,00 und 4,26, im Mittel 3,62, und in 2 Versuchen mit dem *Staphylococcus pyogenes aureus* betrug derselbe 1,14 und 1,42, im Mittel 1,28.

Das Ergebnis der Versuche mit dem Tuberkelbacillus war nicht so absolut konstant wie die Resultate der eben angeführten Experimente. Es betrug nämlich in 3 Experimenten der phagocytäre Index unter dem Einfluß der Radium-Emanation 1,02, 1,10 und 1,03, was eine Zunahme der Intensität der Phagocytose bedeutet; allerdings war diese Zunahme so gering, wenigstens in dem ersten und dritten der angeführten Versuche, daß dieselbe sehr wohl noch in den Fehlergrenzen der Zählungen liegen konnte. In 8 Versuchen ohne Serum schwankte der phagocytäre Index unter dem Einfluß der Radium-Emanation zwischen 0,63 und 0,90 und betrug im Mittel 0,73, und in 4 Versuchen, in welchen die Flüssigkeit Serum enthielt, schwankte derselbe zwischen 0,50 und 0,95 und betrug im Mittel 0,70.

Obwohl, ausgenommen 2 Versuche mit dem *Bacterium coli* und Serumzusatz, in welchen die Phagocytose unter dem Einfluß der Radium-Emanation bedeutend verstärkt wurde, die Emanation in den vorliegenden Versuchen im allgemeinen auf die Phagocytose der Bakterien keine besonders starke Einwirkung ausübte, indem dieselbe die Intensität der Phagocytose um ca. 30 Proz. vergrößerte resp. verminderte, so spricht doch die Konstanz, mit welcher die Emanation die Phagocytose des *Bacterium coli* und des *Staphylococcus pyogenes aureus* verstärkte und die Häufigkeit, mit welcher sie die Phagocytose des Tuberkelbacillus abschwächte, entschieden dafür, daß das Resultat dieser Versuche nicht akzidentell ist, resp. in den Fehlergrenzen der Untersuchung liegt, besonders wenn man die oben angegebenen Umstände, welche bei dieser Untersuchung berücksichtigt worden waren, in Betracht zieht.

Nachdem die Verstärkung der Phagocytose des *Bacterium coli* und des *Staphylococcus pyogenes aureus* unter dem Einfluß der Radium-Emanation festgestellt worden war, mußte entschieden werden, ob dieselbe durch die Einwirkung der Radium-Emanation auf die Phagocyten oder auf die Bakterien oder auf beide Elemente zustande kommt.

Um diese Frage zu lösen, habe ich weitere 4 Versuche mit dem *Bacterium coli* ausgeführt, in welchen in dem oben beschriebenen Apparate und in ähnlicher Weise wie in den oben angeführten Experimenten die Phagocyten und die Bakterienemulsion einzeln der Einwirkung der Radium-Emanation ausgesetzt wurde; darauf wurde den in obiger Weise behandelten Phagocyten resp. Mikroben das zweite der Wirkung der Radium-Emanation nicht ausgesetzte Element beigemischt und etwas Blutserum hinzugefügt. Die Flüssigkeit, in welcher die Phagocytose in diesen Versuchen vor sich ging, bestand gewöhnlich aus 6 Tropfen Phagocyten-Emulsion, 3 Tropfen Bakterien-Emulsion und 6 Tropfen Blutserum. In einem jeden dieser Versuche wurde selbstverständlich eine Kontrolluntersuchung parallel ausgeführt. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt. Es werden hier angegeben sub a) die Zahlen, welche in dem Fall erhalten waren, wenn die Radium-Emanation auf die Phagocyten eingewirkt hatte und sub b), wenn dieselbe auf die Bakterien eingewirkt hatte.

Versuche mit dem *Bact. coli commune*.

Versuch	Unter d. Einfluß der Rad.-Em.		In der Kontrollflüssigkeit		Zahl d. Bakterien in 100 Phagocyten		Phagocytärer Index
	Untersuchte Phagocyten	Enthaltene Bakterien	Untersuchte Phagocyten	Enthaltene Bakterien	Unter dem Einfluß der Rad.-Em.	In der Kontrollflüssigkeit	
XXIII a)	240	771	240	144	354	60	5,90
b)	240	239	240	167	100	70	1,43
XXIV a)	240	249	240	106	100	44	2,27
b)	240	119	240	88	49	37	1,32
XXV a)	240	250	160	49	100	21	4,76
b)	240	122	240	62	51	26	1,96
XXVI a)	240	110	240	78	46	33	1,39
b)	240	96	240	64	40	27	1,48

Es war also in allen diesen Versuchen, in welchen die Radium-Emanation entweder auf die Phagocyten oder auf die Mikroben eingewirkt hatte, die Phagocytose stets verstärkt, zumal in einem hohen Grade. In 3 von diesen Versuchen war dabei die Phagocytose viel mehr verstärkt bei Einwirkung der Radium-Emanation auf die Phagocyten als bei Einwirkung derselben auf die Bakterien; nur in einem Versuche war die Verstärkung der Phagocytose in beiden Fällen ungefähr gleichgroß. Im ersten Fall betrug der phagocytäre Index im Mittel 3,83, im zweiten nur 1,55. Folglich wird die Verstärkung der Phagocytose des *Bacterium coli* durch die Radium-Emanation hauptsächlich durch die Einwirkung derselben auf die Phagocyten und nur in einem geringeren Maße durch die Einwirkung der Emanation auf die Bakterien hervorgerufen.

Daß die Radium-Emanation bei Einwirkung derselben auf die Phagocyten die Avidität derselben steigern kann, folgt auch aus zwei Experimenten, welche ich in einer ganz ähnlichen Weise, wie die Versuche mit Bakterien; mit Karminkörnern ausgeführt habe. Obwohl die in diesen Versuchen gebrauchte Karminemulsion ziemlich dünn war, war es bei der starken Phagocytose der Körner meist unmöglich, die Zahl der durch die Phagocyten aufgenommenen Körner genau zu bestimmen. Es wurde also in diesen Versuchen, wo 160 bis 200 Phagocyten in jedem Falle untersucht wurden, nur die Prozentzahl derjenigen Phagocyten bestimmt, welche überhaupt Karminkörner in ihr Plasma aufgenommen hatten. Derselben Methode, welche zweifelsohne weniger genau ist als diejenige, die ich bei den Versuchen mit Bakterien gebrauchte, hat sich auch Keith in seinen Untersuchungen über die Beziehungen zwischen Hämolyse und Phagocytose von roten Blutkörperchen bedient. In diesen 2 Versuchen mit Karminkörnern betrug der phagocytäre Index unter dem Einfluß der Radium-Emanation 1,18 und 1,13. Es erhellt aus der oben angegebenen Methodik dieser zwei Experimente, daß der Wert des Resultates derselben nur ein relativer sein kann. Obige 2 Versuche scheinen nur eine Bestätigung der aus den mit Bakterien ausgeführten Versuchen fließenden Folgerung mit sich zu bringen, nämlich, daß die Radium-Emanation bei dieser Intensität der Wirkung derselben, wie dies in den



vorliegenden Experimenten der Fall war, die Phagocytose wenigstens gewisser Fremdkörper, darunter gewisser Bakterien, durch ihre auf die Phagocyten ausgeübte Wirkung verstärken kann.

Es wurde schon oben bemerkt, daß das Resultat meiner mit dem Tuberkelbacillus ausgeführten Versuche mit der von Reiter aus seinen Untersuchungen gezogenen Schlußfolgerung in Widerspruch steht. Es spricht sich zwar Reiter mit einer gewissen Reserve aus, er gibt nämlich an, daß die Radium-Emanation unter Umständen durch direkte Einwirkung auf die Bakterien diese vor der Phagocytose schützen zu können scheint, auf Grund seiner Versuche glaubt er aber behaupten zu können, daß die Emanation die phagocytäre Tätigkeit der Blutzellen (bei der Phagocytose des Tuberkelbacillus) anzuregen scheint, in einzelnen Fällen bis zu 30 Proz. Reiter hat in seinen Versuchen als Quelle der Radium-Emanation das von einem Bade-Emanator der Charlottenburgschen Gesellschaft gelieferte Wasser gebraucht; der Gehalt derselben an Radium-Emanation war ungefähr derselbe wie dies in meinen Experimenten der Fall war, die Methodik der Reiterschen Versuche war aber in verschiedenen Experimenten verschieden, war auch eine andere als die von mir gebrauchte und eignete sich für derartige Versuche meiner Ansicht nach weniger gut als die in der vorliegenden Untersuchung angegebene Methodik.

Es ist schwer zu entscheiden, welcher Umstand die Differenz meiner Versuche mit dem Tuberkelbacillus und derjenigen Reiters hervorgerufen hat. Wahrscheinlich ist es die Verschiedenheit der Methodik; hoffentlich werden weitere Untersuchungen obige Differenz klären und den faktischen Tatbestand in dieser Frage feststellen.

Es ist aus den Versuchen, welche ich mit dem *Bacterium coli* angestellt habe, ersichtlich, daß die Radium-Emanation nicht nur auf die Phagocyten, sondern auch auf die Bakterien eine Wirkung ausübt. Die aus meinen Versuchen hervorgehende Verschiedenheit des Einflusses, welchen der in Rede stehende Faktor *caeteris paribus* auf die Phagocytose verschiedener Mikroben ausübt, bestätigt einigermaßen obigen Befund und spricht entschieden dafür, daß die Radium-Emanation bei gleicher Intensität ihrer Einwirkung und

gleichen anderen Versuchsbedingungen die Leichtigkeit, mit welcher verschiedene Bakterien von den Phagocyten aufgenommen werden, in verschiedener Weise beeinflußt. Das Ergebnis meiner Versuche, aus welchen es ersichtlich ist, daß die Radium-Emanation die Phagocytose des *Bacterium coli* und des *Staphylococcus pyogenes* verstärkt, und die Phagocytose des *Tuberkelbacillus* abschwächt, steht im Einklang mit dem oben angegebenen Befunde der Untersuchungen über die bakterizide Wirkung der Radium-Emanation; es folgt schon aus diesen Untersuchungen, daß der *Tuberkelbacillus* auf die Einwirkung der Radium-Emanation anders reagiert, als mehrere andere Bakterienarten.

Dasselbe steht auch in einem gewissen Einklange mit den Resultaten der bis dahin noch spärlichen Versuche einer lokalen therapeutischen Anwendung der Radium-Emanation bei Infektionskrankheiten. Es werden hier nämlich die klinischen Resultate von Bartels bei einem eitrigen Prozeß nach Influenza, diejenigen von Bulling bei Erkrankungen der Atmungsorgane und die negativen Ergebnisse der Suessschen Versuche bei Tuberkulose von Meerschweinchen gemeint. Es ist wohl möglich, daß die Verschiedenheit der Resultate dieser Versuche durch die Differenz der bakteriziden Wirkung der Radium-Emanation auf verschiedene Mikroben hervorgerufen war; es ist aber ebenfalls recht möglich, daß dieselbe auch von der verschiedenen Einwirkung der Radium-Emanation auf die Phagocytose der verschiedenen Bakterienarten abhängig war.

Die Phagocytose von Bakterien ist eine komplizierte Erscheinung, welche von der Lebenstätigkeit sowohl der Phagocyten wie auch der Bakterien abhängt, auf welche verschiedene äußere Faktoren einen großen Einfluß ausüben. Einige derselben sind uns bekannt, durchaus aber nicht alle den Mechanismus der Phagocytose betreffende Fragen haben eine definitive Lösung erfahren. So ist es z. B. noch eine offene Frage, ob die chemotaktische Wirkung einer gewissen Bakterienart, welche in einem Fall positiv und in einem anderen negativ sein kann, nur von der Menge resp. der Konzentration einer und derselben Bakterienprodukte abhängt, oder ob die verschiedene Richtung der chemotaktischen



Wirkung durch verschiedene Bakterienprodukte hervorgerufen wird. Die in den Körperflüssigkeiten enthaltenen, auf die in natürlichen Verhältnissen sich abspielende Phagocytose von Mikroben einen Einfluß ausübenden Faktoren sind ebenfalls noch wenig bekannt, zumal noch hypothetisch, so daß von einer genauen Analyse der auf dieselben gerichteten Einwirkung der Radium-Emanation zurzeit noch keine Rede sein kann; die Arbeit von Schütze über die Einwirkung der Radium-Emanation auf bakterielle Antikörper, welche den ersten Schritt in dieser Richtung bildet, fällt in die letzten Zeiten.

Mit einem Wort, bei dem heutigen Stand unserer Kenntnisse über die Phagocytose von Bakterien ist es noch nicht möglich, nach Feststellung des Einflusses irgendeines Faktors auf die genannte Erscheinung, die Analyse des Mechanismus der gegebenen Einwirkung sehr weit zu führen. Alle hier in Betracht kommenden Erklärungen hätten ja nur den Wert von Hypothesen. Daher erscheint es wohl richtiger, sich auf die Feststellung der auf experimentellem Wege gefundenen Tatsachen zu beschränken.

#### Zusammenfassung.

1) Radium-Emanation, aus Wasser befreit, in welchem dieselbe in der Menge von 1 000 000 Emanationseinheiten enthalten ist, übt auf die Phagocytose von Bakterien in vitro einen Einfluß aus.

2) Der Einfluß der Radium-Emanation auf die Phagocytose verschiedener Bakterien ist verschieden: derselbe verstärkt die Phagocytose des *Bacterium coli commune* und des *Staphylococcus pyogenes aureus* und schwächt die Phagocytose des *Tuberkelbacillus* ab.

3) Die Radium-Emanation wirkt sowohl auf die Phagocyten, wie auch auf die Bakterien.

4) Die Radium-Emanation übt auf verschiedene Bakterien eine verschiedene Wirkung aus: ihre Wirkung auf das *Bacterium coli commune* und den *Staphylococcus pyogenes aureus* ist eine andere als auf den *Tuberkelbacillus*.

5) Die Verstärkung der Phagocytose des *Bacterium coli commune* durch die Radium-Emanation ist hauptsächlich durch

die Einwirkung derselben auf die Phagocyten und in einem geringeren Maße durch deren Einwirkung auf die Bakterien hervorgerufen <sup>1)</sup>).

#### Literatur.

- v. Baeyer, Zeitschr. f. allg. Physiol., 1904. Ref. in Journ. de Physiol. et de Path. gén., 1905.  
 Bartels, Zeitschr. f. neuere physikal. Med., 1907.  
 Bouchard et Balthazard, C. r. de l'Ac. des Sc., 1906. Ref. in Journ. de Physiol. et de Path. gén., 1906.  
 —, Curie, P., et Balthazard, C. r. de l'Ac. des Sc., 1904.  
 Bulling, Berliner klin. Wochenschr., 1909.  
 Bulloch, Transact. of the Pathol. Soc. of London, 1905, zit. nach Wright.  
 Dautwitz, Zeitschr. f. Heilkunde, 1906. Ref. in Biophys. Centralbl., 1905/6.  
 Dorn, Baumann und Valentiner, Zeitschr. f. Hyg., 1905. Ref. in Centralbl. f. Bakt., 1906.  
 Goldberg, Inaug.-Diss. der Mil.-med. Ak. in Petersburg, 1906.  
 Hekma, Biochem. Zeitschr., 1908.  
 Keith, zit. nach Wright.  
 Klecki, Przegl. lek., 1909.  
 Löwenthal, Berliner klin. Wochenschr., 1910.  
 London, Ref. in Journ. de Physiol. et de Path. gén., 1904.  
 Reiter, Centralbl. f. Röntgenstrahlen, Radium und verwandte Gebiete, 1910.  
 Rheinhardt, Berl. klin. Wochenschr., 1906.  
 Sauerbeck, Zeitschr. f. Immunitätsf. und exper. Ther., 1909.  
 Sawtschenko, Barykin i Maikow, Russkij Wratsch, 1910.  
 Schaper, Deutsche med. Wochenschr., 1904.  
 Schütze, Med. Klinik, 1911.  
 Suess, Zeitschr. f. Tuberkul., 1908. Ref. in Biophys. Centralbl., 1909.  
 Winterbert, C. r. de l'Ac. des Sc., 1906. Ref. in Journ. de Physiol. et de Path. gén., 1907 und C. r. de la Soc. de Biol., 1906. Ref. in Biophys. Centralbl., 1905/6.  
 Wright, Studien über Immunisierung und ihre Anwendung in der Diagnose und Behandlung von Bakterieninfektionen, Jena 1909.  
 — and Stewart, R., Douglas, Proc. of the Royal Soc., 1904, zit. nach Wright.

---

1) Ein Bericht über vorliegende Untersuchungen wurde der mathematisch-naturwissenschaftlichen Klasse der Akademie der Wissenschaften in Krakau vorgelegt.

*Nachdruck verboten.*

[Travail des Laboratoires de Physiologie et de Bactériologie et  
Hygiène de l'Université de Gand.]

**Le rôle des acides aminés dans l'intoxication protéinique.  
L'anaphylaxie est due à l'intervention des acides aminés  
et du complément.**

Par le Docteur **Henri De Waele**,  
médecin-adjoint à l'Hôpital civil de Gand.

(Eingegangen bei der Redaktion am 25. März 1912.)

**Chapitre I.**

**Sur l'influence des colloïdes et des substances voisines,  
spécialement, des acides aminés sur l'intoxication protéinique.**

On a reconnu dans ces dernières années l'énorme importance qui revient aux lipoides dans l'activité physiologique des cellules. Les substances solubles dans les lipoides, telles les anesthésiques, pénètrent dans le protoplasme des cellules en se dissolvant dans les lipoides qui constituent la paroi et une partie de la texture des cellules (théorie de Meyer et d'Overton).

Nombre de substances cristallisables, non solubles dans les lipoides, exercent déjà une action à une concentration à laquelle elles n'agissent pas sur les albumines: on a expliqué ce fait en se basant sur la constatation que les ions ont sur les lipoides et sur les colloïdes en général, une action modificatrice (précipitante ou dissolvante). L'état d'ionisation implique nécessairement une concentration faible; or c'est précisément à l'état de grande dilution que ces substances cristallisables se rencontrent dans l'organisme vivant; elles aussi agiraient donc par l'intermédiaire des lipoides et des colloïdes en général.

Dans un travail récent, nous avons pu établir que la théorie de la narcose s'applique également à l'intoxication par les alcaloïdes et. fait plus curieux encore, aux toxines microbiennes; les alcaloïdes s'absorbent par l'intermédiaire des lipoides, les toxines par celui du complément.

Pour les alcaloïdes ce sont les lécithines qui interviennent, pour les toxines, ce serait tout ou partie de l'alexine ou complément.

Nous nous sommes demandé si les peptones dont on connaît l'action toxique quand on les injecte dans le système circulatoire, ne sont pas fixées d'une façon analogue par l'intermédiaire des lipoides ou de colloïdes du même genre.

Des trois ordres de réaction que provoque l'injection de peptones: baisse de la pression sanguine, retard de la coagulation du sang, diminution

du nombre de leucocytes, nous nous sommes intéressé surtout à la première et accessoirement à la seconde.

L'obligation de rester dans les doses moyennes de lipoides, pour éviter éventuellement leur action propre, nous a engagé à employer la dose minima de peptone de Witte, qui produit constamment une baisse appréciable de la pression sanguine; elle correspond à 0.03 g par kg d'animal.

#### Peptone de Witte.

1. Chien, mâle, de 7.200 kg, reçoit 0.21 g de peptone en 30 cc. de liquide physiologique.

Pression sanguine 67 mm, pouls 52 à la minute. Injection en 15 sec.

35 sec. après l'injection débute la chute de pression.

50 sec. après l'injection: pression 60 mm, pouls 146,

5 min. " " " 68 " " 55.

#### Lécithine.

Nos expériences ont été faites avec la lécithine Merck, émulsionnée au mortier avec un peu d'eau distillée, et ajoutée 2 à 3 minutes avant l'injection, à la peptone en solution dans le liquide physiologique.

Danilewsky a établi, par des essais sur le cœur isolé, que la lécithine augmente la force des contractions cardiaques. Kaznelson, au Laboratoire de Lawrow, arrive aux mêmes conclusions.

Nos conditions d'expériences sont toutes différentes, il s'agit de solutions concentrées, en injection intraveineuse. Nous avons donc établi d'abord l'action de ces solutions.

#### Lécithine Merck.

2. Chien de 7.5 kg, reçoit 0.5 g de lécithine, en 30 cc., soit 0.06 g par kg d'animal.

Pression 76 mm, pouls 80. Injection en 17 sec.

2 min. après l'injection la pression est 78 mm, le pouls à 96,

7 " " " " " " 85 " " " " 100,

l'amplitude des pulsations est devenue plus petite, le sang coagule plus lentement.

3. Chien de 8.5 kg, reçoit 1 g de lécithine en 25 cc., soit 0.12 g par kg animal.

Pression carotidienne en 62 mm. Injection en 28 sec.; déjà pendant l'injection débute la chute.

15 sec. après l'inj. la pression est 39 mm, pouls accéléré, petit,

8 min. " " " " " 32 mm, le sang coagule lentement.

4. Chien, mâle, de 6.2 kg, reçoit 1.5 g de lécithine en 50 cc., soit 0.24 g par kg.

Pression 71 mm. Injection en 20 sec., aussitôt après la pression monte à 80 mm.

4 min. après, la pression est 70 mm, amplitudes petites,

10 " " " " " 71 " amplitudes plus grandes,

15 " " " " " 71 " amplitudes plus grandes,  
le sang coagule lentement.

5. Chien de 8.5 kg (suite de l'expérience 3). Après l'injection de lécithine la pression était 32 mm.

10 min. après cette première injection, on donne 0.3 g de peptone de Witte en 25 cc.; l'injection est faite en 24 sec.

Pas de modifications sensibles de la courbe. L'ascension qui avait débutée avant cette seconde injection, continue progressivement.

En résumé, la lécithine exerce une action comparable à celle de la peptone, elle abaisse la pression, et diminue la coagulabilité, et ce d'une façon plus durable que la peptone. Le maximum d'action s'obtient avec des doses moyennes, soit 0.12 g par kg; avec des doses plus fortes l'effet est probablement compensé par l'action cardiotonique musculaire. Une injection de lécithine confère l'immunité vis à vis d'une seconde injection de lécithine et aussi vis à vis d'une injection de peptone.

Choline. Il faut aussi tenir compte de ce que la lécithine est sujette à se décomposer, et à mettre en liberté de la choline; or l'action cardio-toxique de la choline, étudiée déjà antérieurement, fut reprise en 1908 par Modrakowsky, et par Busquet et Pachon. Le premier avait admis que la choline pure a un effet hypertensif, Busquet et Pachon employent de préférence le chlorhydrate de choline, plus stable. A la dose de 1 à 2 mg par kg cette substance produit chez le chien de l'hypotension immédiate, mais très passagère; 4 à 5 mg donnent au contraire une hypertension vasoconstrictive surtout au niveau du rein.

Nos expériences faites avec la choline de Kahlbaum, confirment ces résultats et nous permettent d'y ajouter que la coagulation du sang est ralentie, et qu'il y a immunité pour une injection de peptone faite peu après.

L'action de la choline ressemble donc à celle de la lécithine.

Après avoir établi l'action de la lécithine injectée seule, voyons si elle influence les effets de la peptone.

#### A. Doses petites.

6. Chien, mâle, de 8.7 kg, reçoit 0.4 g de peptone de Witte, en 40 cc. plus 0.02 de lécithine, soit 0.003 g par kg, et un rapport de 1 de lécithine pour 20 de peptone.

Pression 77, pouls 60, amplitude 8. Injection en 40 sec. Aussitôt, chute rapide.

Après 1 min.	Pression 77 mm	Pouls 80	Ampl. 4
" 5 "	" 76 "	" 48 "	" —
" 15 "	" 70 "	" 34 "	" 15
" 25 "	" 70 "	" 36 "	" 18

#### B. Doses plus fortes.

7. Chien, mâle, de 6.5 kg, reçoit 0.18 g de peptone plus 0.4 de lécithine en 30 cc. de liquide physiologique, soit 0.06 g de lécithine par kg et un rapport de 2 de lécithine pour 1 de peptone.

Pression 58 mm, pouls 45, amplitude 17 mm. Injection en 15 sec.

15 sec. après : Pression 44 mm Pouls 79 Ampl. 8 mm

3 min. " " 60 " " 64 " 12 "

14 " " " 60 " " 44 " 16 "

8. Chien, mâle, de 6.7 kg, reçoit 0.3 de peptone et 1 g de lécithine, en 40 cc. de liquide physiologique, soit 0.15 g de lécithine par kg et un rapport de 3.2 de lécithine pour 1 de peptone.

Pression 71 mm, pouls 40, amplitude 12 mm. Injection en 27 sec.

10 sec. après : Pression 68 mm Pouls — Ampl. —

1 min. " " 63 " " 90 " —

3 " " " 70 " " 62 " —

10 " " " 73 " " 112 " 2.

9. Chien, mâle, de 7 kg, reçoit 0.22 g de peptone et 1.5 g de lécithine en 50 cc., soit 0.21 g par kg et un rapport de 7 de lécithine pour 1 de peptone.

Pression 66 mm, pouls 40, amplitude 22 mm. Injection en 15 sec.

15 sec. après : Pression 63 mm Pouls 71 Ampl. 20 mm

5 min. " " 66 " " 97 " 3 "

9 " " " 65 " " 53 " 14 "

15 " " " 66 " " 44 " 18 "

10. Chien, mâle, de 5.2 kg, reçoit 0.15 g de peptone plus 1.5 de lécithine, soit 0.28 g par kg et un rapport de 10 de lécithine pour 1 de peptone.

Pression 61 mm, pouls 59, amplitude 29 mm. Injection en 27 sec.

40 sec. après : Pression 49 mm Pouls 124 Ampl. 8 mm

3 min. " " 66 " " 108 " 7 "

10 " " " 70 " " 62 " 15 "

#### C. L'immunité après l'injection de peptone avec lécithine.

11. Chien, mâle, de 6 kg, reçoit 0.18 g de peptone plus 2 g de lécithine, en 30 cc., soit 0.33 g par kg et un rapport de 10 de lécithine pour 1 de peptone.

Pression 39 mm, pouls 49, amplitude 35 mm. Injection en 23 sec.

20 sec. après : Pression 31 mm Pouls 128 Ampl. 7 mm

90 " " " 29 " " 138 " 3 "

10 min. " " 34 " " 60 " 10 "

20 " " " 32 " " 55 " 22 "

2<sup>e</sup> injection de 0.18 g de peptone:

1 min. après : Pression 30 mm Pouls 55 Ampl. 24 mm.

En résumé, l'action de la peptone et celle de la lécithine s'ajoutent, toutes deux donnent l'immunité propeptonique: il est donc probable que toutes deux exercent une action similaire sur la coagulabilité du sang et que la lécithine agisse par la partie «choline» de sa molécule.

#### Lipoïdes voisins de la lécithine.

Avec la lécithine il est facile de faire une émulsion bien homogène; le protagon s'y prête moins bien, la cérébrine pas du tout. Seulement nous avons pu constater que l'addition

d'un peu de bile (maximum 1 %) permet de faire une émulsion parfaite non seulement avec le protagon et avec la cérébrine, mais aussi avec la cholestérine et les acides aminés que nous étudierons plus loin.

Toutefois, il fallait établir que cette quantité de bile ne pouvait pas développer une action appréciable par elle même, et vicier les conditions d'expérience.

#### Bile de Chien.

12. Chien, mâle, de 6.4 kg, reçoit 0.65 cc. de bile de chien en 25 cc. de liquide physiologique, soit 0.1 cc. par kg et une dose double de celle qui sera employée en addition aux produits étudiés.

Pression 40 mm, pouls 68, amplitude 13 mm. Injection en 14 sec.

10 sec. après: Pression — mm Pouls 92 Ampl. — mm

40 " " " 40 " " 68 " 13 "

3 1/2 min. " " 40 " " 75 " 11 " , coag. norm.

2<sup>e</sup> injection: 0.25 g de peptone en 25 cc.:

30 sec. après: Pression 37 mm Pouls 88 Ampl. 15 mm, coag. norm.

Donc à la dose employée la bile n'a pas d'action cardiotonique, ni thromboplastique bien appréciable.

#### A. Cérébrine.

13. Chien, mâle, de 8 kg, reçoit 0.25 g de peptone de Witte et 2 g de cérébrine en 30 cc., soit 0.25 de cérébrine par kg et un rapport de 8 de cérébrine pour 1 de peptone.

Pression 46 mm, pouls 44, amplitude 27 mm. Injection en 50 sec., aussitôt débute une forte chute.

20 sec. après: Pression 15 mm

30 " " " 12 " " , l'animal succombe

1 min. " " 0 " " , l'animal succombe

#### B. Protagon.

14. Chien de 6 kg, reçoit 0.22 de peptone et 0.5 de protagon en 25 cc., soit 0.008 de protagon par kg et un rapport de 2.2 de protagon pour 1 de peptone.

Pression 53 mm, pouls 88, amplitude 8 mm. Injection en 22 sec., bientôt chute lente.

1 min. après: Pression 18 mm Pouls 128 Ampl. 1 mm

12 " " " 22 " " 110 " 1 "

17 " " " 38 " " 104 " 2 "

2<sup>e</sup> injection de 0.25 g de peptone en 30 sec.

1 min. après: Pression 41 mm Pouls 112 Ampl. 3 mm.

Donc tout comme pour la lécithine, le protagon et la cérébrine paraissent ajouter leur action propre à celle de la peptone.

### C. Cholestérine.

15. Chien de 7.5 kg, reçoit 2 g de cholestérine Merck, soit 0.26 g par kg.

Pression 51 mm, pouls 72, amplitude 9 mm. Injection en 14 sec., aussitôt chute.

15 sec. après: Pression 16 mm, arrêt des pulsations et de la respiration,  
20 „ „ „ 16 „ , courte reprise,  
pendant 5 min. une pulsation en 20 sec.,  
5 min. après: mort de l'animal.

16. Chien, mâle, de 6.5 kg, reçoit 0.2 g de peptone et 2 g de cholestérine (émulsionnée à l'aide de 0.3 g de taurocholate de soude [Kahlbaum]), soit 0.3 g de cholestérine par kg et un rapport de 10 de cholestérine pour 1 de peptone.

Pression 48 mm, pouls 58, amplitude 25 mm. Injection en 58 sec., aussitôt chute forte à 14 mm.

A la fin de l'injection légère reprise, puis chute à 12 mm et mort de l'animal.

17. Chien, mâle, de 6 kg, reçoit 0.45 g de peptone plus 1 g de cholestérine, soit 0.16 g par kg et un rapport de 2.2 g de cholestérine pour 1 de peptone

Pression 56 mm, pouls 54, amplitude 28 mm. Injection en 12 sec. de suite chute rapide, resp. de Cheine-Stokes.

45 sec. respiration et pulsations imperceptibles.  
1 min. après l'animal succombe.

Tout comme le fait la lécithine, la cholestérine ajoute son effet propre à celui de la peptone.

### D. Les acides aminés.

Bien que les acides aminés ne soient pas des colloïdes, notre attention a été appelée sur eux à l'occasion de l'observation suivante: l'addition de peptone à l'émulsion de certains échantillons de leucine transforme presque instantanément ces émulsions en des solutions claires et limpides. Cette propriété nous a fait entrevoir la possibilité de combinaisons spéciales entre ces substances.

Nous nous occuperons successivement:

1° de la tyrosine, acide aminé de la série aromatique: acide paroxyphénylaminopropionique;

2° d'acides aminés de la série grasse:

- a) le glycyl ou glycolle: acide aminoacétique;
- b) l'alanine: acide aminopropionique;
- c) la leucine: acide aminocapronique ou aminobutylacétique.



### Tyrosine.

18. Chien de 6.5 kg, reçoit 0.2 g de peptone plus 0.5 g de tyrosine émulsionnés à l'aide d'un peu de bile, soit 0.08 g de tyrosine par kg et un rapport de 2.5 de tyrosine pour 1 de peptone.

Pression 52 mm, pouls 52, amplitude 19 mm. Injection en 15 sec.

10 sec. après, débute une chute rapide.

12 " " pression 40 mm

20 " " " 31 " bientôt arrêt du cœur et de la respiration.

19. Chien de 7.5 kg, reçoit 0.2 g de peptone plus 1 g de tyrosine Merck, soit 0.14 g par kg et un rapport de 5 de tyrosine pour 1 de peptone.

Pression 44 mm, pouls 73, amplitude 20 mm. Injection en 12 sec., aussitôt chute.

20 sec. après: Pression 17 mm Pouls 17 Ampl. 20 mm

90 " " " 36 " " 143 " 2 "

6 min. " " " 30 " " 120 " 2 "

12 " " " 32 " " — " — coag. 45 min.

17 " " " 37 " " 146 " 2 "

25 " " " 39 " " 110 " 5 "

2° injection de peptone seule, en 20 sec., aussitôt chute.

10 sec. après: Pression 19 mm Pouls 75 Ampl. 3 mm

20 min. " situation à peu près analogue, l'expérience est arrêtée.

En somme, la tyrosine accentue notablement la dépression sanguine caractéristique de l'intoxication propeptonée; elle augmente donc le pouvoir thromboplastique. Toutefois cette réaction intense ne crée pas dans les délais habituels, du moins, l'immunité propeptonique. Elle ne paraît donc pas stimuler la sécrétion d'antithrombine.

### a) Glycyl.

20. Chien de 6 kg, reçoit 0.2 g de peptone et 2 g de glycyl Schuckhardt, en 25 cc., soit 0.33 g de glycolle par kg et un rapport de 10 de glycyl pour 1 de peptone.

Pression 44 mm, pouls 60, amplitude 11 mm. Injection en 22 sec.

15 sec. après: début de la chute

45 " " Pression 15 mm Pouls 156 Ampl. 1 mm

3 min. " " " 10 " " 112 " 1 "

14 " " " 35 " " 92 " 2 "

19 " " " 33 " " 52 " 9 "

2° injection de peptone en 10 sec.:

15 sec. après: Pression 33 mm Pouls 52 Ampl. 9 mm (immunité).

La première chute est bien plus forte que ne la produirait la dose de peptone employée seule.

Le glycol paraît donc agir pour son compte et ajouter son action à celle de la peptone.

## b) Alanine.

**21.** Chien, femelle, de 9 kg. reçoit 0.30 de peptone plus 1.5 g d'alanine (König), soit 0.17 g par kg et un rapport de 5 d'alanine pour 1 de peptone.

Pression 55 mm, pouls 52, amplitude 20 mm. Injection en 12 sec.

30 sec. après: Pression 60 mm Pouls 100 Ampl. 4 mm

3 min. " " 66 " " 44 " 11 "

16 " " " 60 " " 40 " 12 " coag. lente.

2° injection en 10 sec. de peptone seule:

45 sec. après: Pression 56 mm Pouls 44 Ampl. 12 mm.

**22.** Chien, mâle, de 6 kg, reçoit 0.23 de peptone plus 1 g d'alanine (Kahlbaum), soit 0.17 g par kg et un rapport de 4.5 d'alanine pour 1 de peptone.

Pression 43 mm, pouls 64, amplitude 25 mm. Injection en 9 sec.

15 sec. après: Pression 28 mm Pouls 88 Ampl. 10 mm

90 " " " 32 " " 72 " 25 "

9 min. " " 38 " " 84 " 25 "

2° injection de peptone en 8 sec:

30 sec. après: Pression 38 mm Pouls 84 Ampl. 22 mm.

**23.** Chien, mâle, de 7 kg, reçoit 0.25 g de peptone plus 1 g d'alanine (Kahlbaum) soit 0.14 g par kg et un rapport de 4 d'alanine pour 1 de peptone.

Pression 56 mm, pouls 56, amplitude 35 mm. Injection en 10 sec.: aussitôt chute.

50 sec. après: Pression 28 mm Pouls 120 Ampl. 5 mm

7 min. " " 19 " " 75 " 3 "

18 " " " 40 " " 50 " 15 "

2° injection identique:

20 sec. après: Pression 25 mm Pouls 92 Ampl. 9 mm

35 " " " 40 " " 50 " 18 "

En somme, l'adjonction d'alanine à la peptone n'influence pas notablement la propriété de diminuer la pression carotidienne; elle accentue au contraire la courte élévation de la pression qui s'observe fréquemment avant la chute. Cependant l'alanine König semble avoir atténué la chute de la pression.

## c) Leucine.

Les divers produits que nous avons pu nous procurer sous le nom de leucine présentent de grandes différences au point de vue des propriétés physiques.

D'ailleurs cela confirme les données fournies par la bibliographie. Obtenue par la trypsine, la leucine correspond à la formule de l'acide aminobutylacétique et serait soluble dans l'eau dans la proportion de 1:30 à 1:45; celle préparée par l'acide chlorhydrique, serait soluble 1:106; la leucine synthétique aurait une solubilité de 1:100. Le pouvoir rotatif, la

fusibilité différent d'après les échantillons; optiquement ils sont dextro- ou levogyres ou inactifs et transformables sous ce rapport (Schultz 1885).

Ici comme pour les substances précédentes, l'addition d'un petit peu de bile permet de réaliser une émulsion suffisamment homogène.

Rappelons que l'addition d'une solution de peptone à l'émulsion de certains échantillons de leucine transforme celles-ci en solutions claires et limpides.

### 1. Leucine seule.

24. Chien, mâle, de 6 kg, reçoit 1 g de leucine Merck en 25 cc., soit 0.16 g par kg.

Pression 40 mm, pouls 68, amplitude 15 mm. Injection en 45 sec.

4 min. après: Pression 40 mm Pouls 72 Ampl. 6 mm

8 " " 42 " 60 " 4 " coag. rapide

9 " " 2<sup>e</sup> injection, de 0.5 de peptone en 20 sec.

45 sec. " Pression 42 mm Pouls 72 Ampl. 5 mm, coag. rapide.

La leucine n'a donc par elle-même pas d'action sensible sur la pression sanguine; mais elle favorise énergiquement la coagulabilité du sang. Cependant cette action ne dure que 10 à 12 minutes, pour faire place ensuite à un certain retard de la coagulation.

Les effets de l'injection de leucine rappellent, mais avec des différences d'intensité et de délais, l'intoxication propeptonique.

Une injection de leucine confère l'immunité propeptonique.

### 2. Peptone de Witte et leucines diverses.

25. Chien, mâle, de 8.5 kg, reçoit 0.25 g de peptone plus 0.01 g de leucine Grubler I, soit 1.25 de leucine pour 1 de peptone.

Pression 28 mm, pouls 80, amplitude 14 mm. Injection en 18 sec.

15 sec. après: début d'une chute rapide

45 " " Pression 6 mm Pouls 148 Ampl. 2 mm

4 min. " " 26 " 72 " 8 "

9 " " 2<sup>e</sup> injection: pas de modifications.

26. Chien de 6.5 kg, reçoit 0.25 g de peptone plus 0.5 g de leucine Grubler II, soit 0.08 g de leucine par kg et un rapport de 2 de leucine pour 1 de peptone (liquide clair).

Pression 32 mm, pouls 60, amplitude 10 mm. Injection en 18 sec.

12 sec. après: début de la chute

45 " " Pression 8 mm Pouls 88 Ampl. 4 mm

2 min. " " 13 " 124 " 2 "

10 " " 15 "

**27.** Chien de 8 kg, reçoit 0.25 g de peptone plus 1 g de leucine Grubler II, soit 0.12 g par kg et 4 de leucine pour 1 de peptone (liquide clair).

Pression 54 mm, pouls 140, amplitude 5 mm. Injection en 18 sec.

13 sec. après: débute la chute

1 min. „ Pression 24 mm Pouls 128 Ampl. 2.5 mm

9 „ „ „ 21 „ „ 152 „ 1.5 „

10 „ „ reprise leute.

**28.** Chien de 6 kg, reçoit 0.20 g de peptone plus 1 g de leucine naturelle de Schuckhardt, soit 1.6 de leucine par kg et un rapport de 5 de leucine pour 1 de peptone (liquide clair).

Pression 50 mm, pouls 48, amplitude 25 mm. Injection en 18 sec., aussitôt chute.

1 min. après: Pression 52 mm Pouls 160 Ampl. 2 mm

4 „ „ „ 48 „ „ 108 „ 2 „

6 „ „ „ 57 „ „ 66 „ 7 „

**29.** Chien, mâle, de 7 kg, reçoit 0.3 g de peptone plus 1 g de leucine Merck, soit 1.4 g par kg et un rapport de 3.3 de leucine pour 1 de peptone (liquide louche).

Pression 59 mm, pouls 64, amplitude 20 mm. Injection en 28 sec.

20 sec. après: Pression 41 mm Pouls 128 Ampl. 3 mm

90 „ „ „ 54 „ „ 60 „ 22 „

**30.** Chien de 7.5 kg, reçoit 0.3 de peptone plus 1 g de leucine König, soit 1.3 g par kg et un rapport de 3.3 de leucine pour 1 de peptone (liquide louche).

Pression 50 mm, pouls 44, amplitude 30 mm. Injection en 10 sec.

20 sec. après: chute légère

45 „ „ Pression 40 mm Pouls 140 Ampl. 5 mm

2 min. „ „ 49 „ „ 96 „ 9 „

4 „ „ „ 48 „ „ 48 „ 28 „ coag. lente.

**31.** Chien, de 6.5 kg, reçoit 0.20 g de peptone plus 1 g de leucine synthétique Kahlbaum, soit 0.15 g par kg, et un rapport de 5 de leucine pour 1 de peptone (liquide louche).

Pression 50 mm, pouls 72, amplitude 15 mm. Injection en 19 sec., bientôt légère chute.

45 sec. après: Pression 42 mm Pouls 76 Ampl. 5 mm

5 min. „ „ 50 „ „ 60 „ 20 „ coag. lente.

**32.** Chien de 6.5 kg, reçoit 0.23 g de peptone plus 1 g de leucine synthétique Schuckhardt, soit 4.5 de leucine pour 1 de peptone (liquide louche).

Pression 67 mm, pouls 80, amplitude 18 mm. Injection en 14 sec., la courbe n'est pas modifiée beaucoup.

15 sec. après: Pression 71 mm Pouls 112 Ampl. 7 mm

1 min. „ „ 70 „ „ 80 „ 16 „

2 „ „ „ 70 „ „ 80 „ 18 „

**33.** Chien de 5 kg, reçoit 0.23 g de peptone plus 1 g d'acide aminocapronique Schuckhardt, soit 4 de leucine pour 1 de peptone.

Pression 46 mm, pouls 52 ampl. 27 mm. Injection en 5 sec.; modifications très faibles,

15 sec. après: Pression 47 mm Pouls 88 Ampl. 10 mm  
1 min " " 47 " " 48 " 28 "

34. Chien de 5.5 kg, reçoit 0.25 g de peptone plus 1 g de leucine Grubler II, soit 4 de leucine pour 1 de peptone.

Pression 30, pouls 60, ampl. 23 mm. Injection en 8 secondes.

45 sec. après: Pression 35 mm Pouls 154 Ampl. 2 mm  
90 " " 30 " " 80 " 20 "

2<sup>e</sup> injection de peptone seule, en 10 sec.

40 sec. après: Pression 32 mm Pouls 52 Ampl. 27 mm

35. Chien de 7.5 kg, reçoit 0.25 g de peptone plus 1 g de leucine Grubler II, soit 4 de leucine pour 1 de peptone.

Pression 62 mm, pouls 56, amplitude 37 mm. Injection en 25 sec., presque pas de modifications.

45 sec. après: Pression 60 mm Pouls 72 Amplitude 30 mm

4 min. après: 2<sup>e</sup> injection de peptone seule, en 20 sec.

30 sec. après: Pression 62 mm Pouls 74 Amplitude 27 mm

36. Chien de 5 kg, reçoit 0.15 g de peptone plus 1 g de leucine naturelle Kahlbaum, soit 6.5 de leucine pour 1 de peptone.

Pression 70 mm, pouls 40, amplitude 22 mm. Injection en 18 sec., de suite légère hausse passagère à 75.

30 sec. après: Pression 67 mm Pouls 80 Ampl. 17 mm

12 min. " " 72 " " 76 " 16 " coag. lente.

En somme, l'addition de leucine à la peptone de Witte manifeste de influences que l'on peut résumer ainsi:

Les leucines (Grubler II; leucine naturelle Schuckhardt) dont la suspension dans le liquide physiologique devenait claire au contact de la peptone de Witte (qui sont donc parfaitement solubles dans ces peptones), aggravent l'action de ces peptones.

Au contraire, les leucines dont la suspension ne s'éclaircissait pas en présence de la peptone, et ajoutées comme les précédentes dans la proportion de 3 à 5 parties leucine pour 1 de peptone diminuent et neutralisent l'action intoxicante de la peptone d'après les doses et avec des différences d'après les provenances. Ces leucines, d'après leur activité désintoxicante, se rangent dans l'ordre suivant en commençant par la plus faible: leucine Merck, leucine König, leucine synthétique Kahlbaum, leucine synthétique Schuckhardt; acide aminocaproïque Schuckhardt, leucine Grubler II, leucine naturelle Kahlbaum.

Mais toujours on constate plusieurs minutes après l'injection un retard notable dans la vitesse de coagulation du sang et il existe de l'immunité propeptonique.

L'action neutralisante de ces leucines paraît donc s'exercer en atténuant la dépression sanguine; cependant il y a accélération du pouls (voir: Ch. II, § des albumoses). Elle ne paraît entraver l'incoagulabilité du sang ni l'immunité propeptonique.

Nous verrons dans au chapitre II que la peptone de Witte contient déjà 45 % d'acides aminés, ce qui double la proportion énoncée plus haut et fait que dans ces expériences on a en somme 6 à 10 parties d'acides aminés pour 1 de protéines.

### 3. La leucine et d'autres peptones commerciales.

Choisissant parmi les leucines employées plus haut, un produit que nous venons de reconnaître comme actif; l'acide aminocapronique de Schuckhardt, nous l'avons associé successivement à une série de peptones commerciales: de Grubler, de Cornelis, de de Nayer, de Chapoteaut, de Defresne. Cette leucine donne avec ces différentes peptones des mélanges qui ne s'éclaircissent pas. (Voir au Chapitre II pour comparés les courbes obtenues avec ces peptones injectées seules.)

**37.** Chien, mâle, de 7 kg, reçoit 0.35 g de peptone de Grubler plus 1.5 g de leucine, soit 0.05 g de peptone par kg et un rapport de 4.5 de leucine pour 1 de peptone.

Pression 47 mm, pouls 48, amplitude 37 mm. Injection en 12 sec., d'abord légère hausse, après 15 sec. baisse.

1 min. après:	Pression 38 mm	Pouls 128	Ampl. 8 mm
4 " "	" 50 "	" 52	" 30 "
9 " "	" 50 "	" 36	" 34 "

2<sup>e</sup> injection identique.

1 min. après: Pression 45 mm Pouls 36 Ampl. 34 mm, sang incoag.

**38.** Chien, femelle, de 7.5 kg. reçoit 0.4 g de peptone de Grubler plus 1 g de leucine, soit 0.05 de peptone par kg et un rapport de 2.5 de leucine pour 1 de peptone.

Pression 66 mm, pouls 64, amplitude 24 mm. Injection en 10 sec., aussitôt chute lente.

30 sec. après:	Pression 50 mm	Pouls 128	Amplitude 4 mm
3 min. "	" 67 "	" 56	" 21 "
6 min. "	" 67 "	" 48	" 25 "

2<sup>e</sup> injection identique en 10 sec.

15 sec. après:	Pression 57 mm	Pouls 60	Amplitude 25 mm
1 min. "	" 67 "	" 42	" 25

39. Chien, mâle, de 6 kg, reçoit 0.25 g de peptone de Cornelis plus 1 g de leucine, soit 0.04 g de peptone par kg et un rapport de 4 de leucine pour 1 de peptone.

Pression 45 mm, pouls 56, amplitude 26 mm. Injection en 10 sec. courte hausse à 54 mm, puis chute à 27 mm.

45 sec. après:	Pression	32 mm	Pouls	180	Amplitude	3 mm
1 mm "	"	44 "	"	92	"	8 "
6 " "	"	49 "	"	52	"	20 "
17 " "	"	45 "	"	60	"	20 "

2<sup>e</sup> injection identique.

30 sec. après: Pression 36 mm Pouls 52 Amplitude 25 mm  
10 min., sang incoag.

40. Chien, femelle, de 5.5 kg, reçoit 1.5 de peptone de Nayer plus 1 g de leucine, soit 0.03 de peptone par kg, et un rapport de 6 de leucine pour 1 de peptone.

Pression 45 mm, pouls 62, amplitude 30 mm. Injection en 15 sec., bientôt chute de la pression.

30 sec. après: Pression 5 mm, petit et rare.  
1 min., l'animal succombe.

41. Chien, mâle, de 6 kg, reçoit 0.25 g de peptone de Nayer plus 1 g de leucine, soit 0.04 g par kg et un rapport de 4 de leucine pour 1 de peptone.

Pression 67 mm, pouls 44, amplitude 27 mm. Injection en 16 sec., aussitôt chute de la pression.

15 sec. après:	Pression	20 mm.
30 sec. après:	Pression	17 mm Pouls 68 Ampl. 3 mm
1 min. "	"	20 " " 24 " 1 "
10 min. "	"	24 " " 30 " 4 "

l'animal se remet très lentement, le sang est incoagulable.

42. Chien, mâle, de 7 kg, reçoit 0.35 g de peptone de Chapoteaut plus 1 g de leucine, soit 0.035 g par kg, et un rapport de 3 de leucine pour 1 de peptone.

Pression 40 mm, pouls 68, amplitude 25 mm. Injection en 12 sec., aussitôt accélération du pouls.

1 min. après:	Pression	43 mm	Pouls	160	Ampl.	1 mm
4 " "	"	41 "	"	52	"	18 "
10 " "	"	35 "	"	44	"	28 "

2<sup>e</sup> injection en 13 sec.

12 sec. après, accélération et petitesse du pouls pendant 8 sec.  
30 sec. " Pression 40 mm Pouls 44 Ampl. 28 mm, sang incoag.

43. Chien, mâle, de 6 kg, reçoit 0,5 g de peptone Defresne plus 2 g de leucine pour 1 de peptone.

Pression 46 mm, pouls 68, amplitude 24 mm. Injection en 12 sec., la respiration devient irrégulière.

1 min. après:	Pression	50 mm	Pouls	84	Ampl.	20 mm
5 " "	"	42 "	"	76	"	25 "
10 " "	"	42 "	"	76	"	25 " sang incoag.

2<sup>e</sup> injection en 12 sec., respiration irrégulière.

45 sec. après:	Pression	49 mm	Pouls	64	Ampl.	30 mm
2 min.	"	68	"	"	64	32 "
4 "	"	49	"	"	64	30 "

Ainsi donc, le peptone de Grubler que l'on sait avoir des propriétés très voisines de la peptone de Witte, quand elle est donnée en injection intraveineuse au chien, voit comme cette dernière, diminuer son action dépressive par l'addition de leucine à dose élevée; mais l'incoagulabilité du sang et l'immunité se produisent néanmoins.

Ajoutée à la peptone de Cornelis et à celle de Chapoteaut elle traduit encore son intervention.

Elle paraît agir beaucoup moins sur la peptone de de Nayer ou même en accentuer les effets dépressifs.

Elle rend aussi plus intenses les manifestations habituelles de la peptone de Defresne: d'abord hausse, puis seulement baisse de la pression sanguine.

La leucine choisie pour ces expériences donne avec les différentes peptones des mélanges qui ne s'éclaircissent pas; elle se trouve donc dans les conditions où elle désintoxique la peptone de Witte, et cependant nous venons de constater que son activité se traduit très différemment d'après les peptones employées. Les divergences observées doivent donc tenir à des différences dans la composition de ces peptones. C'est à établir à quels facteurs sont dues les propriétés qui distinguent les peptones entr'elles, qu'est consacré le second chapitre de notre travail.

### Résumé.

Les conclusions partielles que nous avons énoncées à propos de chacune des substances lipoides et colloïdes (lécithine, protagon, cérébrine, cholestérine), essayées en addition aux peptones pour éprouver leur influence sur l'intoxication propeptonique, expriment toutes un résultat négatif: elles ajoutent simplement leur action propre à celle des peptones.

Parmi les acides aminés, les uns (glycyl, alanine) sont sans grande influence, d'autres (tyrosine, leucines dont les émulsions s'éclaircissent au contact des peptones) aggravent les symptômes de l'intoxication propeptonique; enfin les leucines dont les émulsions restent troubles, laissent entrevoir



une influence évidente; leur action diffère d'après la dose et d'après la peptone à laquelle elle sont ajoutées; elle se dégagera mieux dans le chapitre suivant de notre travail, quand nous aurons établi à quels facteurs sont dues les différences dans l'action des diverses peptones.

#### **Bibliographie.**

- De Waele, H., Recherches sur l'anaphylaxie contre les toxines et sur le mode d'absorption des toxines. *Zeitschr. f. Immunitätsf.*, Bd. 3, 1909.  
— Du rôle des lécithines dans l'absorption et l'action des alcaloïdes. *Ibidem*.  
— Sur l'interprétation de l'incubation. *Ibidem*, Bd. 4, 1909.  
Danilewsky, Acad. des Sciences, 1895.  
Kaznelson, Ueber die Wirkung der Lecithine auf das isolierte Warmblüterherz. *Pharmak. Inst. Prof. Lawrow, Dorpat* 1910.  
Modrakowsky, *Pflügers Archiv*, Bd. 124.  
Busquet et Pachon, *C. R. Soc. de Biologie, Paris* 1909 et 1910.

#### **Chapitre II.**

**A quelle partie des peptones commerciales faut-il attribuer le pouvoir toxique?**

##### **L'intervention obligée des acides aminés.**

Le phénomène de l'intoxication propeptonée, ou de Schmidt-Muhlheim: c'est à dire les manifestations de l'action d'une injection intraveineuse (ou simplement parentérale) de propeptone sur la pression du sang, sur les gaz du sang, sur la coagulabilité du sang et sa teneur en leucocytes et enfin la production de l'immunité propeptonique ont surtout été étudiées à l'aide de la peptone de Witte.

Nous venons d'attirer l'attention sur l'influence que l'addition de leucine peut avoir sur ces manifestations, mais en même temps nous avons constaté que cette influence dépend en première ligne de la peptone employée.

Il paraissait donc probable que les effets attribués à la propeptone ne soient pas dus à la peptone de Witte dans son ensemble, mais à telle partie qui y serait mieux représentée que dans d'autres peptones et qui subirait plus spécialement l'influence de la leucine.

Le problème avait déjà attiré l'attention de divers auteurs et la solution en fut cherchée en injectant aux animaux des

parties diverses de produits de digestions artificielles, isolées, purifiées et identifiées autant que possible. On conçoit que par suite de l'incertitude et du peu d'unité qui existe dans les méthodes de préparation et de purification de ces substances insuffisamment définies au point de vue chimique, les résultats aient traduit de nombreux désaccords.

Pour les peptones pepsiques, Politzer et plus tard, Grosjean, établirent que les propeptones sont plus actives que les peptones vraies. Pour Thompson, les albumoses primaires sont plus actives que les deuteroalbumoses.

Nolf constate que les peptones pepsiques sont les plus toxiques, que les peptones pancréatiques le sont vingt fois moins, et que les peptones leucocytaires le sont moins encore. Mais il ne peut confirmer l'opinion de Thompson, puisque ses peptones pepsiques contenaient  $\frac{2}{3}$  d'albumoses primaires et  $\frac{1}{3}$  d'albumoses secondaires, tandis que ses peptones pancréatiques renfermaient  $\frac{3}{4}$  d'albumoses primaires et  $\frac{1}{4}$  d'albumoses secondaires; enfin, ses peptones leucocytaires n'avaient que des albumoses primaires. Ces proportions sont donc en contradiction avec les conclusions de Thompson, à moins que n'intervienne un facteur dont il n'a pu être tenu compte.

Chittenden, Mendel et Henderson estiment que les propeptones dérivées de l'ovalbumine, quel que soit le mode de leur préparation (par l'acide sulfurique dilué ou par l'intermédiaire de ferments, soit pepsine, soit pancréatine, soit papaïne) sont comparables dans leur action.

Zuntz trouve que les albumoses agissent peu sur la pression sanguine, et que généralement une légère hausse précède une baisse peu accusée.

Roger établit qu'à mesure que la digestion d'une albumine est poussée plus loin, la toxicité des produits diminue; les premiers sont toxiques, les derniers, abiurétiques, le sont à peine.

Nous même, nous avons montré en collaboration avec Vandevelde, que les injections d'albumines sont moins bien supportées que celles de peptones, et que l'élimination azotée est tout à fait exagérée dans le premier cas.

Pick et Spiro s'attachent surtout à l'action anticoagulante. Ils préparent les produits à employer de différentes

façons; ils précipitent les parties encore coagulables et se servent des albumoses et peptones qu'ils remettent en solution à l'aide d'une légère quantité d'alcali. Ils observent souvent une dissociation de l'action sur la pression sanguine et de l'action anticoagulante; bref leurs résultats sont si peu concordants qu'ils attribuent l'effet anticoagulant à une substance peu abondante mais très active qu'ils appellent «peptozyme», laquelle serait un chaînon de la molécule protéique, libéré dans certains cas d'hydrolyse, altéré dans d'autres conditions et qui se trouverait dans l'extrait de divers organes même en l'absence d'albumoses et de peptones.

Nolf fait à ces expériences le reproche qu'on n'y a pas tenu compte d'un facteur dont il fait ressortir toute l'importance. L'injection doit être rapide pour traduire nettement et entièrement son action anticoagulante. Il a d'ailleurs fourni une explication bien mieux établie de cette manifestation en lui donnant pour base l'action antithrombique du foie: l'incoagulabilité naît secondairement, la peptone excitant une sécrétion d'antithrombosine du niveau du foie. Cette explication est d'ailleurs admise assez généralement.

Nous avons suivi pour résoudre le problème une voie différente des précédentes. Les produits d'hydrolyse sont éprouvés par injection au chien tels qu'ils sont achetés ou obtenus. En même temps ils sont analysés au point de vue de leur composition en substances coagulables, albumoses, peptones et acides aminés. Nous devons ces analyses à la collaboration de notre ami le Dr. A. J. J. Vandeveld, directeur du Laboratoire de la ville de Gand.

Voici la méthode suivie:

1° De la solution primitive on prélève une partie pour évaluer par la méthode de Kjeldahl le chiffre d'azote total.

2° La solution primitive est chauffée en présence d'un peu d'acide acétique. Le précipité recueilli sur un filtre donne par la méthode de Kjeldahl un chiffre d'azote correspondant aux protéines coagulables.

3° Le filtrat obtenu par la manipulation précédente est traité par l'acide sulfurique (10 cc. au  $\frac{1}{8}$  pour 125 cc. de filtrat) et par le sulfate de zinc cristallisé, à saturation. On

précipite ainsi les albumoses que l'on évalue également par la méthode de Kjeihdal.

4° Le filtrat résultant de la manipulation précédente (No. 3) est précipité par l'acide phosphotungstique (Phosphorwolframsäure) frais de Merck (20 cc. de filtrat plus 10 cc. d'acide sulfurique à 25 % plus 4 cc. d'acide phosphotungstique à 10 %). Le précipité se compose des peptones, que l'on soumet ensuite à la méthode de Kjeihdal.

5° Le filtrat du 4° contient les acides aminés, dont on calcule le chiffre par différence.

Aux différentes peptones dont il a été question dans le chapitre précédent, nous avons ajouté, à cause de sa richesse en albumoses, un produit acheté sous le nom de syntonine Merck.

Nous réunissons dans ce tableau les résultats de l'analyse de ces diverses substances.

Résultat des analyses (exprimés en g d'azote, dans 100 g de substance.

	Witte poudre	Witte spong.	Grub- ler	Cor- nelis	De Nayer	Chapo- teaut	Synto- nine	De- fresne
Humidité en %	6.32	45	4.19	11.19	13.75	9.82	12.82	11.19
Azote total	14.99	8.75	15.31	14.21	13.80	14.43	13.95	14.21
Azote des proté- ines coagulables	3.79	0.90	3.14	2.08	2.20	2.03	1.35	1.55
Az. des albumoses	2.78	2.57	2.30	3.71	1.84	3.41	10.40	1.14
Azote des peptones	1.83	4.35	1.47	1.36	0.61	0.57	1.20	4.09
Az. des ac. aminés	6.59	0.93	8.42	7.06	9.15	8.45	1.0	7.51
Acidité, $\frac{1}{10}$ N	500	600	1065	1345	1120	660		1230

Proportion des proto- et deuteroalbumoses

Albumos. primair. (protero et hetero)	0.40	0.54	0.54	0.13	1.33	2.20		0.82
Deuteroalbumoses	2.38		1.76	3.58	0.51	1.21		0.32
Total	2.78		2.30	3.71	1.84	3.41		1.14

Nous n'avons guère de données sur le mode de fabrication de ces diverses peptones; seule la peptone de Cornelis porte l'indication pepsino-tartrique. La peptone de Witte serait obtenue à l'intervention de la pepsine; celle de de Nayer par la vapeur d'eau surchauffée.

44. Chien, femelle, de 8.5 kg, reçoit 0.3 g de peptone de Cornelis en 25 cc. de liquide physiologique, soit 0.035 g par kg d'animal; deux fois successivement.

Pression 60 mm, pouls 80, amplitude 15 mm. Injection en 10 sec.

1 min. après, début d'une légère chute.

1½ min. après: Pression 48 mm Pouls 140 Ampl. 2 mm

2½ " " " 55 " " 88 " 8 "

4 " " " 53 " " 66 " 13 "

2° injection en 1 sec.:

1 min. après: Pression 55 mm Pouls 72 Ampl. 15 mm

45. Chien, femelle, de 6.5 kg, reçoit 3 g de peptone de Cornelis, en 35 cc., 0.5 g par kg.

Pression 57 mm, pouls 52, amplitude 13 mm. Injection en 14 sec., aussitôt hausse, petitesse du pouls, puis:

25 sec. après: Pression 56 mm Pouls 200 Ampl. 4 mm

15 min. " " 53 " " 100 " 5 "

30 " " " 53 " " 70 " 12 "

2° injection en 17 sec., bientôt hausse:

6 sec. après: Pression 60 mm Pouls 152 Ampl. 6 mm

1½ min. " " 40 " " 148 " 4 "

13 " " " 52 " " 68 " 12 "

46. Chien, femelle, de 6.5 kg, reçoit 0.2 g de peptone de de Nayer, soit 0.035 par kg.

Pression 55 mm, pouls 55, amplitude 31 mm Injection en 10 sec.

10 sec. après, débute une hausse.

30 sec. après: Pression 70 mm Pouls 125 Ampl. 5 mm

50 " " " 60 " " 60 " 20 " coag. très lente

5 min. " " 56 " " 60 " 20 "

2° injection en 8 sec., aussitôt hausse, courte puis baisse.

15 sec. après: Pression 45 mm Pouls 115 Ampl. 7 mm

40 " " " 60 " " 46 " 28 "

5 min. " " 56 " " 46 " 28 "

3° injection en 7 sec.:

15 sec. après, débute la chute

20 sec. après: Pression 45 mm Pouls 120 Ampl. 6 mm

35 " " " 58 " " 50 " 30 "

1 min. " " 58 " " 50 " 28 " coag. rapide

47. Chien, mâle, de 5 kg, reçoit 0.4 g de peptone de de Nayer, soit 0.08 g par kg.

Pression 27 mm, pouls 92, amplitude 6 mm. Injection en 12 sec., aussitôt chute à 20 mm, puis:

30 sec. après: Pression 25 mm Pouls 150 Ampl. 3 mm

2½ min. " " 14 " " 140 " 1.5 " coag. très lente

9 " " " 22 " " 125 " 2 "

2° injection en 10 sec.: quelques oscillations, puis hausse.

1 min après: Pression 39 mm Pouls 152 Ampl. 2.5 mm

48. Chien, mâle, de 6.5 kg, reçoit 0.75 g de peptone de de Nayer, soit 0.085 g par kg.

Pression 30 mm, pouls 55, amplitude 27 mm. Injection en 9 sec.

15 sec. après: Pression 23 mm Pouls 133 Ampl. 3 mm

remonte très progressivement

15 min. après: Pression 28 mm Pouls 54 Ampl. 15 mm

## 2° injection en 12 sec.:

20 sec. après:	Pression 21 mm	Pouls 96	Ampl. 9 mm
2 min. "	" 29 "	" 126 "	" 4 "
6 " "	" 26 "	" 72 "	" 15 " coag. lente.

49. Chien, mâle, de 7.5 kg, reçoit 3.75 g de peptone de de Nayer, soit 0.5 g par kg.

Pression 51 mm, pouls 60, amplitude 25 mm. Injection en 13 sec., aussitôt légère hausse, puis baisse.

1 min. après:	Pression 36 mm	Pouls 212	Ampl. 1 mm
7 " "	" 38 "		
22 " "	" 55 "	" 96 "	" 4 "
28 " "	" 48 "	" 72 "	" 10 "
32 " "	" 48 "	" 72 "	" 10 "

## 2° injection en 15 sec.:

10 sec. après:	Pression 40 mm	Pouls 152	Ampl. 9 mm
1 min. "	" 40 "	" 172 "	" 3 " forte dyspnée
6 " "	" 37 "	" 64 "	" 10 "
20 " "	" 52 "	" 64 "	" 10 " sang incoag.

50. Chien, mâle, de 8.7 kg, reçoit 0.35 g de peptone de Chapoteaut, soit 0.046 par kg.

Pression 47 mm, pouls 80, amplitude 17 mm. Injection en 10 sec., guère de modifications de la courbe.

6 min. après:	Pression 47 mm	Pouls 58	Ampl. 25 mm
---------------	----------------	----------	-------------

## 2° injection en 15 sec.:

15 sec. après:	Pression 38 mm	Pouls 80	Ampl. 30 mm
30 " "	" 46 "	" 44 "	" 32 "

51. Chien, mâle, de 6.5 kg, reçoit 1.70 g de peptone de Chapoteaut, soit 0.26 g par kg.

Pression 55 mm, Pouls 60, amplitude 25 mm. Injection en 10 sec.

5 sec. après:	Pression 70 mm	Pouls 176	Ampl. 3 mm
1 min. "	début de chute.		
5 min. après:	Pression 58 mm	Pouls 40	Ampl. 18 mm
11 " "	" 55 "	" 40 "	" 28 "

## 2° injection en 8 sec., aussitôt hausse.

1 min. après:	Pression 85 mm	Pouls 112	Ampl. 7 mm
2 " "	" 57 "	" 52 "	" 28 "

52. Chien, femelle, de 6 kg, reçoit 0.5 g de peptone de Defresne, soit 0.08 g par kg.

Pression 57 mm, pouls 58, amplitude 21 mm. Injection en 13 sec., aussitôt hausse.

10 sec. après:	Pression 70 mm	Pouls 52	Ampl. 25 mm
5 min. "	" 61 "	" 56 "	" 21 "
8 " "	" 61 "	" 56 "	" 21 "

## 2° injection en 14 sec., aussitôt hausse:

6 sec. après:	Pression 74 mm	Pouls 48	Ampl. 10 mm
5 min. "	" 58 "	" 72 "	" 15 " coag. assez lente

53. Chien, femelle, de 6.5 kg, reçoit 0.25 g de syntonine de Merck (voir tableau d'analyses), soit 0.04 g par kg.

Pression 40 mm, pouls 43, amplitude 25 mm. Injection en 14 sec.: guère de modifications de la courbe.

10 min. après, id.

2<sup>e</sup> injection en 6 sec.:

4 sec. après, débute une chute rapide.

25 sec. après, Pression 15 mm, pouls rare, amplitude 1 mm.

1 $\frac{1}{2}$  min. après, l'animal succombe.

54. Chien, femelle, de 6.5 kg, reçoit 0.4 g de syntonine de Merck, soit 0.6 g par kg.

Pression 50 mm, pouls 66, amplitude 30 mm. Coag. 6 min. Leucocytes: 12 000. Injection en 10 sec., d'abord légère hausse, puis baisse.

25 sec. après: Pression 38 mm Pouls 186 Ampl. 3 mm

2 $\frac{1}{2}$ min.	"	"	50	"	"	114	"	11	"	
5	"	"	46	"	"	76	"	20	"	coag. en 45 min.
										leucocytes: 4000

8 $\frac{1}{2}$	"	"	"	45	"	"	54	"	20	"
-----------------	---	---	---	----	---	---	----	---	----	---

2<sup>e</sup> injection en 12 sec.:

3 sec. après, débute une chute rapide

30 sec. après: Pression 3 mm Pouls 150 Ampl. 1 mm coag. en 15 min.  
leucocytes: 500

1 min. après: l'animal succombe.

Donc, une injection de 0.04 g par kg de Syntonine Merck est sans effet, 0.06 g par kg traduisent une action très faible; la coagulation sanguine est retardée, mais il ne se développe pas d'immunité, bien au contraire cette première injection sensibilise l'animal, lui donne une anaphylaxie immédiate, de sorte qu'une seconde injection est très active, voire mortelle.

On pourrait chercher à en induire que les phénomènes de l'intoxication propeptonée exigent pour leur production un facteur présent ou réveillé dans l'organisme. Mais ce serait anticiper, nous serons conduits d'une façon progressive à des considérations de ce genre un peu plus loin.

Remarquons pour le moment que ce produit désigné comme syntonine Merck est notablement différent des autres peptones que nous avons employées: à côté de sa richesse presque exclusive en albumoses il contient très peu d'albumine coagulable et également très peu d'acides aminés.

Or, nous avons vu que l'addition de leucine aux peptones influence notablement leur pouvoir toxique; nous avons donc ajouté de la leucine à cette syntonine dans les expériences suivantes:

55. Chien, femelle, de 6 kg, reçoit 0.3 g de syntonine Merck, plus 0.9 g de leucine synthétique Schuckhardt, émulsionnée avec un peu de

bile, soit 0.005 g de syntonine par kg et un rapport de 3 de leucine pour 1 de syntonine.

Pression 50 mm, pouls 51, amplitude 23 mm, coag. en 4 min., leucocytes 12 000. Injection en 7 sec.

7 sec. après, débute une chute rapide, pouls petit, respiration superficielle et rare.

30 sec. après, arrêt du cœur, l'animal succombe. Coag. en 8 min. Leucocytes 10 500.

56. Chien, mâle, de 6.5 kg, reçoit 0.5 g de syntonine Merck, plus 0.9 g de leucine, soit 0.077 g par kg et un rapport de 2 de leucine pour 1 de syntonine.

Pression 46 mm, pouls 96, amplitude 5 mm. Injection en 26 sec., aussitôt baisse.

20 sec. après: Pression 19 mm Pouls 88 Ampl. 2.5 mm

90 " " " 41 " " 108 " 1 " coag. en 30 min.

2 min. " " 26 " " 68 " 15 "

13 " " " 48 " " 100 " 6 "

15 " " " 48 " " 100 " 6 "

2° injection en 20 sec. de 0.5 de syntonine seule, de suite chute.

20 sec. après: Pression 19 mm Pouls 80 Ampl. 2 mm

40 " " amélioration

2 min. " Pression 47 mm " 100 " 5 " coag. en 12 min.

12 " " " 47 " " 100 " 5 "

14 " " " 50 " " 114 " 3 "

3° injection, de 0.5 de syntonine seule.

Immédiatement la pression baisse, après quelques secondes l'animal reprend un peu puis succombe.

57. Chien, mâle, de 4.5 kg, reçoit 0.2 g de syntonine plus 2 g de leucine, soit 0.04 g de syntonine par kg et un rapport de 10 de leucine pour 1 de syntonine.

Pression 50 mm, pouls 44, amplitude 34 mm. Injection en 15 sec., aussitôt baisse.

10 sec. après: Pression 37 mm, pouls 116, amplitude 2 mm

30 " " l'animal s'agite, la pression tombe rapidement à 13 mm

3 min. " l'animal succombe.

Donc du moment où l'on ajoute à cette syntonine, qui est à proprement parler une substance presque entièrement composée d'albumoses, une certaine quantité de leucine elle devient active. Mais il faut remarquer que la dose de leucine doit être assez grande et nous n'avons pas observé d'autre part, qu'une proportion de 10 de leucine pour 1 d'albumose ait un effet désintoxiquant, comme elle l'aurait avec le peptone de Witte.

En analysant les courbes sphygmographiques obtenues avec les diverses peptones, on constate que l'action la plus caractéristique est donnée par la peptone de Witte, puis par la peptone



de Grubler (hémialbumose). La peptone Cornelis se rapproche encore de ces deux premières; les autres s'en écartent notablement.

Si l'on complète cette analyse comparative des courbes en les mettant en parallèle avec les résultats de l'analyse chimique, on constate successivement:

1° que la réaction caractéristique des peptones n'est pas en rapport avec le degré d'acidité du produit; toutes ces peptones sont acides, les plus acides ne sont pas les plus actives;

2° la quantité absolue d'acides aminés n'a pas non plus d'action directe; la peptone de Nayer qui en contient 75 %, est peu active (nous savons par le chapitre I que les acides aminés seuls n'ont que fort peu d'action par eux-mêmes sur la pression sanguine, mais qu'ils ralentissent la coagulation et donnent l'immunité propeptonique);

3° les peptones vraies ne paraissent pas non plus devoir être rendues responsables de l'action dite des propeptones; en effet la peptone Defresne, de beaucoup la plus riche en peptones vraies (30 %), a une action bien moins caractéristique que les peptones de Witte et de Grubler;

4° si l'on considère les albumoses dans leur ensemble, ou bien d'après la proportion des proto- ou des deuteroalbumoses on ne trouve pas de rapport direct entre ces quantités et l'intensité du pouvoir toxique. Bien plus, le produit acheté sous le nom de syntonine Merck, et qui à l'analyse se montra composé surtout d'albumoses (70 %), est inactif employé comme tel. Remarquons cependant que les peptones commerciales qui sont riches en albumoses manifestent leur action d'abord par une hausse de la pression sanguine, suivie d'une chute plus ou moins prononcée. Seulement cette hausse s'accompagne d'une grande augmentation de la fréquence des pulsations et de petitesse du pouls (voir d'ailleurs à ce sujet le travail de Zuntz, publié entretemps);

5° il reste des albumines (acid- et alcalialbumines), pour lesquelles on constate un rapport direct entre la quantité de ces substances et l'intensité des phénomènes habituels de l'intoxication propeptonique. Les peptones de Witte et de Grubler sont en effet celles qui sont les plus riches en albumines solubles et coagulables (voir analyses).

Ces premières conclusions concordent assez bien avec celles auxquelles sont arrivés les auteurs précédents et que nous avons rappelées dans l'aperçu bibliographique.

Mais l'analyse chimique nous a montré que toutes ces peptones brutes renferment des acides aminés en proportions diverses, et d'autre part nos expériences avec la syntonine Merck nous ont fait voir l'importance de ces acides, puisque leur adjonction rend actifs des produits qui sans cela ne l'étaient pas.

Ces faits mettent en lumière un facteur nouveau et capital: la présence d'une certaine quantité d'acide aminé est indispensable pour que l'action dite des propeptones puisse se produire. Ces acides paraissent donc être l'intermédiaire obligé entre les peptones et l'organisme. Tous les produits de destruction de l'albumine depuis les acid- et les alcali-albumines jusqu'aux peptones, en passant par les albumoses, sont actives à des degrés divers; les premiers le sont le plus.

La quantité d'acide aminé requise paraît varier; en effet, si l'on considère ce qui se passe avec la peptone de Witte, fort riche en albumines coagulables, on voit qu'une proportion de 23 % d'acide aminé la rend fort active; mais si l'on décuple cette proportion d'acide aminé, le pouvoir toxique diminue considérablement. Au contraire, si à une quantité analogue de syntonine de Merck (albumoses) on ajoute 25 % d'acide aminé, on éveille son pouvoir toxique, et avec 125 % on l'augmente encore davantage. La peptone la plus riche en peptones vraies est moins que d'autres activée par l'addition supplémentaire de leucine.

En résumé, les différents produits de destruction de l'albumine sont capables de produire à des degrés divers l'intoxication propeptonique, la présence d'acides aminés apparaît comme l'intermédiaire obligé entre la protéine et l'organisme. Ces acides doivent être présents en des proportions qui diffèrent: une petite quantité suffit pour les premiers termes; les derniers en exigent de plus grandes. Si l'on a observé que les premiers termes de la désintégration des albumines sont plus toxiques, il est possible que cela tienne à ce qu'il leur faut moins d'acides aminés pour développer leur pouvoir toxique.

### Chapitre III.

#### **Action des albumines, acidalbumines et alcalialbumines. Rôle des acides aminés.**

Nous avons établi dans le chapitre précédent que les peptones commerciales qui renferment les premiers termes de la désintégration des albumines dans la plus grande proportion, sont aussi les plus actives au point de vue de l'intoxication propeptonée. Nous avons démontré de plus que pour ces premiers termes de l'hydrolyse des albumines la présence d'une quantité variable d'acide aminé est nécessaire pour qu'ils puissent développer leur pouvoir toxique.

Dans les expériences qui vont suivre, nous avons voulu vérifier l'exactitude de ces conclusions en partant d'une albumine déterminée: le blanc d'œuf frais et subsidiairement le sérum sanguin, et obtenir aux dépens de ceux-ci des produits riches en acidalbumine ou en alcalialbumine, que le commerce ne nous offrait pas.

Nous avons eu recours pour la préparation et pour l'analyse de ces produits à l'obligeance de notre ami le Dr. A. J. J. Vandeveld, Directeur du Laboratoire Communal de la ville de Gand.

L'acidalbumine a été préparée concurremment avec et sans pepsine de la façon suivante:

A. 100 g de blanc d'œuf frais sont additionnés de 1 cc. HCl 5 fois normal et de 5 cc. d'une solution de Witte à 10 %, dans du liquide physiologique; on y ajoute encore 4 cc. de liquide physiologique pour équilibrer le volume de la préparation B.

Ce mélange séjourne 6 heures à 37 ° C.

Puis on neutralise par 25 cc. de NaOH normal, on ajoute 35 cc. d'eau pour maintenir la concentration en NaCl, au taux du liquide physiologique, et enfin 0.62 g d'acide tartrique pour revenir à l'acidité de la peptone Witte; bref on a ainsi 170 cc. de liquide ayant la concentration physiologique en NaCl et dont 10 cc. renferment environ 0.73 g de protéine (calculé) ou 0.70 g (dosé) et dont l'acidité correspond à celle de la peptone de Witte.

B. La préparation du liquide B est faite sans pepsine, mais avec 5 fois plus d'acide chlorhydrique. Pour éviter les erreurs dans le dosage, on y ajoute 5 cc. d'une solution de pepsine à 10 % portée préalablement à l'ébullition.

C. Une préparation identique à B est simplement neutralisée et conservée ainsi pendant 5 jours à 18° C environ.

Les liquides tryptiques sont préparés de façon analogue:

D. L'une comporte 10 cc. de blanc d'œuf, 5 cc. de carbonate de soude normal et 5 cc. d'une solution de trypsine Merck à 10 %. Après un séjour de 6 heures à 37° C. on y ajoute 5 cc. de HCl normal pour neutraliser et 55 cc. d'eau pour équilibrer les volumes avec 1.17 g de NaCl pour équilibrer la concentration; enfin 0.62 g d'acide tartrique pour ramener la solution à l'acidité de la peptone de Witte.

E. L'autre ne renferme pas de trypsine active, mais pour éviter les erreurs dans les dosages d'azote 5 cc. de la solution de trypsine à 10 %, préalablement chauffée à 100° C.

Tous ces produits, sauf C naturellement, sont employés le jour même de leur préparation: d'une part en injection aux animaux, d'autre part soumis à l'analyse.

L'analyse chimique, par la méthode des dosages d'azote (Kjeldahl) est faite sur le modèle de celles qui forment la base du 2<sup>d</sup> chapitre de notre travail.

Voici les résultats de ces analyses.

Grammes d'azote dans 30 cc. de la préparation.

	A acidalb.- pepsine	B acid- albumine	D alcali- trypsine	E albumine
Total	0.345	0.368	0.350	0.363
Azote des protéines coagulables	0.171	0.268	0.268	0.260
Azote des albumoses	0.017	—	—	0.028
Azote des peptones	0.094	0.084	0.066	0.048
Azote des acides aminés	0.063	0.016	0.017	0.028
Acides aminés en % du total	18	4,3	5	8

I. Voyons d'abord, comme contrôle, les effets de l'injection de blanc d'œuf frais tel quel, et ensuite avec l'adjonction de leucine.

**63.** Chien, femelle, de 4 kg, reçoit 25 cc. de blanc d'œuf frais dans 25 cc. de liquide physiologique, deux fois.

Injection en 20 sec. Pas de modifications du tracé. Coag. en 8 min.

5 min. après, coag. en 5 min.

10 „ „ id.

2° injection: le tracé ne change pas.

20 sec. après, coag. en moins de 1 min., le manomètre s'arrête par coagulation dans l'appareil.

**64.** Chien, mâle, de 9 kg, reçoit 25 cc. de blanc d'œuf frais additionné de 0.2 g de leucine (acide aminocapronique de Schuckhardt), soit 0.3 g de protéines par kg et un rapport de 15 de protéine pour 1 de leucine.

Pression 76 mm, pouls 38, amplitude 32 mm, coag. en 25 min. Injection en 25 sec.

5 sec. après: Pression 71 mm Pouls 40 Ampl. 28 mm

30 „ „ normal

9 min. „ „ „ 72 „ „ 36 „ 30 „ coag. en 8 min.

40 „ „ „ coag. en 15 m

1 heure après, l'animal présente une hémorragie accidentelle de 100 cc. environ, coag. en 7 min.

1½, heure après, coag. en 3 min.

**65.** Chien, mâle, de 4 kg, reçoit 20 cc. de blanc d'œuf frais additionné de 1 g de leucine, puis une 2° injection de 15 cc. de blanc d'œuf seul.

Pression 70 mm, pouls 53, amplitude 25 mm. Injection en 10 sec., courte baisse de 10 sec.

10 sec. après: Pression 70 mm Pouls 75 Ampl. 10 mm

90 „ „ coag. en 10 min.

2½ min. „ Pression 65 mm Pouls 46 Ampl. 20 mm

8 min. „ id.

2° injection en 12 sec., aussitôt chute, puis la pression remonte.

20 sec. après: Pression 66 mm Pouls 85 Ampl. 5 mm

1 min. „ „ 64 „ „ 42 „ 16 „

3 „ „ coag. en 10 min.

En résumé, l'injection de blanc d'œuf ne modifie pas le tracé sphymographique, il favorise la coagulation sanguine; cette action est surtout accusée après la 2° injection.

L'addition de leucine favorise intensément l'augmentation de la coagulabilité du sang et provoque une baisse rapide et de courte durée. Déjà une dose de 0.2 g pour 3.75 g d'albumine (25 cc. de blanc d'œuf) suffit, une dose 5 fois plus forte de leucine est encore plus active.

II. Comme on le voit par le tableau des résultats d'analyse les quatre préparations diffèrent assez peu entre elles; nous les essayerons successivement: d'abord sans addition de leucine, puis après adjonction de cette substance, sous forme d'acide aminocapronique de Schuckhardt.

**66.** Chien, mâle, de 5.5 kg, reçoit 30 cc. de la préparation B, soit environ 18 cc. de blanc d'œuf modifié (contient 4.3 % d'acide aminé) ou encore 0.4 g de protéine par kg.

Pression 64 mm, pouls 75, amplitude 20 mm. Injection en 23 sec., aussitôt chute.

15 sec. après: pression 30 mm, pouls 95, ampl. 1.5 mm.

30 „ arrêt du cœur et de la respiration, l'animal succombe.

**67.** Chien, mâle, de 6 kg, reçoit 30 cc. de la préparation A, soit 18 cc. de blanc d'œuf modifié, avec 18 % d'acides aminés ou encore 0.4 g de protéines par kg.

Pression 57 mm, pouls 99, amplitude 18 mm. Injection en 13 sec., aussitôt légère hausse passagère.

30 sec. après débute la chute.

1 min. après, pression 34 mm, pouls 200, amplitude 1.5 mm

1½ min. la pression commence à remonter.

4 min. après, pression 56 mm, pouls 87, amplitude 15 mm

5 „ id.

2<sup>e</sup> injection en 16 sec., la courbe ne varie pas: il y a immunité.

2½ min. après: coag. en 40 min.

**68.** Chien, mâle, de 4 kg, reçoit 55 cc. de la préparation E, soit environ 32 cc. de blanc d'œuf modifié.

Pression 54 mm, pouls 60, amplitude 23 mm. Injection en 15 sec., d'abord pas de modifications, puis.

1 min. après: Pression 57 mm Pouls 220 Ampl. 4 mm

2 „ „ „ 75 „ „ 75 „ 17 „ coag. en 20 min.

**69.** Chien, mâle, de 3.5 kg, reçoit 50 cc. de la préparation D soit environ 29 cc. de blanc d'œuf modifié.

Pression 37 mm, pouls 105, amplitude 8 mm. Injection en 30 sec.

10 sec. après: Pression 35 mm Pouls 154 Ampl. 8 mm

4 min. „ „ 38 „ „ 108 „ 3 „

12 „ „ „ 48 „ „ 75 „ 17 „

18 „ „ „ 41 „ „ 90 „ 10 „

21 „ „ „ 40 „ „ 85 „ 10 „ coag. en 25 min.

**70.** Chien, mâle, de 5 kg, reçoit 30 cc. de la préparation B, additionnés de 1 g de leucine; soit environ 18 cc. de blanc d'œuf modifié, et un rapport de 2.3 de leucine pour 1 de protéine.

Pression 57 mm, pouls 49, amplitude 30 mm. Injection en 15 sec., aussitôt baisse.

10 sec. après: pression 6 mm

20 „ „ l'animal succombe.

**71.** Chien, mâle, de 6 kg, reçoit 40 cc. de la préparation D additionnés de 0.9 g de leucine, soit 23.5 cc. de blanc d'œuf modifié, équivalant à 0.3 g de protéine par kg, et un rapport de 2.5 de leucine pour 1 de protéine; pour les injections suivantes, la préparation seule.

Pression 50 mm, pouls 80, amplitude 10 mm. Injection en 10 sec.

5 sec. après: Pression 42 mm Pouls 170 Ampl. 2 mm

1 min. „ „ 20 „ „ 140 „ 1.5 „

4 „ „ „ 55 „ „ 83 „ 10 „ coag. en plusieurs

8 „ „ „ 47 „ „ 66 „ 15 „ [heures.

2<sup>e</sup> injection en 10 sec.

5 sec. après:		Pouls 100			
30 "	"	Pression 51 mm	Pouls 152	Ampl. 3.5 mm	
2 $\frac{1}{2}$ min.	"	" 55 "	" 100	" 9 "	
4 $\frac{1}{2}$ "	"	" 53 "	" 88	" 10 "	
6 $\frac{1}{2}$ "	"	" 51 "	" 88	" 10 "	

3<sup>e</sup> injection les effets sont exactement superposables à ceux de la 2<sup>e</sup> inj.:

Coag. en plusieurs heures.

En résumé, les acidalbumines agissent sur la pression sanguine et sur la coagulabilité; les alcalialbumines, même réacidifiées au moment de l'injection au taux de la peptone de Witte, sont pour ainsi dire inactives.

L'addition de leucine renforce notablement les effets de l'acidalbumine et confère une activité marquée à l'alcalialbumine: la chute de la pression est nette et le sang devient incoagulable.

Remarquons à propos de notre préparation d'acidalbumine que déjà la très faible dose de leucine qu'elle contient paraît lui suffire pour exercer son pouvoir toxique.

III. Les expériences suivantes établissent la valeur de l'acidité en elle-même.

72. Chien de 5.5 kg, reçoit 25 cc. de blanc d'œuf acidifié au taux de la peptone de Witte, immédiatement avant l'injection.

La courbe sphygmographique ne manifeste pas de modifications.

Le sang recueilli après 3 min. coagule en 5 min.

73. Chien de 7 kg, reçoit 50 cc. de la préparation B neutralisée peu avant l'emploi, 2 fois.

Pression carotidienne 49 mm, pouls 24, amplitude 27 mm. Injection en 12 sec.

10 sec. après:	Pression 47 mm	Pouls 56	Ampl. 24 mm
2 min. "	" "	" "	" " coag. en 8 min.
6 " "	" 51 "	" 24	" 30 " coag. en 3 heures.

2<sup>e</sup> injection en 15 sec.

20 sec. après:	Pression 62 mm	Pouls 54	Ampl. 28 mm
30 " "	" 51 "	" 32	" 27 " coag. en 40 min.

74. Chien de 4.5 kg, reçoit 25 cc. de la préparation B neutralisée depuis 5 jours et conservée à 18° C.

La courbe ne présente aucune modification ni à la première ni à la seconde injection.

75. Chien de 3.5 kg, reçoit 10 cc. de la préparation B additionnés de leucine; la seconde injection ne comporte que 10 cc. de la préparation B.

Pression 41 mm, pouls 72, amplitude 12 mm. Injection en 10 sec.

12 sec. après: chute rapide à 20 mm; arrêt du cœur et de la respiration pendant 25 sec., puis reprise progressive.

2 min.	Pression 32 mm	Pouls 60	Ampl. 15 mm	
4 "	" "	38 "	" 90	" 10 " coag. en 30 min.
6 "	" "	40 "	" 70	" 11 "

2<sup>e</sup> injection: la courbe n'est pas modifiée (immunité). Coag. en 30 min.

En somme, la leucine dont nous avons montré toute l'importance et le rôle indispensable, n'agit pas en tant qu'acide: elle ne peut pas être remplacée par un acide minéral ou par l'acide tartrique. Toutefois la leucine paraît devoir s'y trouver sous la forme acide. Une neutralisation nette du liquide annihile son effet, tandis qu'une nouvelle addition de leucine rend à la préparation son pouvoir toxique, surtout au point de vue de la pression sanguine, moins au point de vue de rendre le sang incoagulable.

#### IV. Injections de sérum du sang avec et sans addition de leucine.

76. Chien de 5.5 kg, reçoit 2 fois successivement 10 cc. de sérum de chien normal, employé 2 jours après la saignée.

Pression 61 mm, pouls 105, amplitude 11 mm. Coag. en 4 min. Injection en 6 sec., aucune modification.

2 min. après, coag. en 5 min.

5 " après, pression 61 mm, pouls 87, ampl. 14 mm. Coag. en 7 min.

2<sup>e</sup> injection en 10 sec., aucune modification.

1½ min., coag. en 3 min.

4 " coag. en 3 min.

10 " pression 63 mm, pouls 78, ampl. 22 mm. Coag. en 13 min.

77. Chien, mâle, de 5.5 kg, reçoit 10 cc. du même sérum que le chien précédent, additionnés de 0.5 cc. de leucine, soit 0.2 g de protéine par kg, et un rapport de 2 de leucine pour 1 de protéine.

Pression 50 mm, pouls 66, amplitude 32 mm. Coagulation en 12 min. Injection en 6 sec.

5 sec. après débute une chute lente.

1 min. après: Pression 48 mm Pouls 168 Ampl. 5 mm

2 " " 47 " " 102 " 10 "

3 " coag. en 3 min.

L'animal se remet lentement et imparfaitement.

78. Chien, mâle, de 4 kg, reçoit 2 fois 8 cc. de sérum de cheval (anti-streptococcique Moser) conservé aseptiquement depuis 6 ans. La première injection ne produit aucune modification de la courbe, le sang coagule en 4 minutes.

La seconde injection faite 5 min. après la première, ne modifie pas non plus le tracé. Le sang coagule en 6 minutes.

79. Chien, mâle, de 5 kg, reçoit 8 cc. du même sérum de cheval, additionnés de 0.4 cc. de leucine, le tout en 20 cc., la seconde injection se compose de 10 cc. de sérum avec 10 cc. de liquide physiologique.



Pression 45 mm, pouls 95, amplitude 11 mm. Injection en 12 sec.:  
effet tardif.

45 sec. après:	Press. 43 mm	Pouls 126	Ampl. 5 mm	
1 $\frac{1}{2}$ min. après	" 43 "	" 85 "	11 "	coag. en 1 $\frac{1}{2}$ heure
7 "	" 43 "	" 55 "	20 "	
10 "	id.			

2<sup>e</sup> injection en 12 sec., aucune modification du tracé.

2 $\frac{1}{2}$  min. après: Press. 43 mm Pouls 53 Ampl. 15 mm. coag. en 6 min.

L'injection de sérum, disent les auteurs, ne provoque chez les animaux aucun accident ni primitif ni tardif. Nolf en particulier rappelle qu'on n'est jamais parvenu à produire aucun effet de propeptone en injectant brusquement dans les veines du chien, du sérum emprunté à d'autres chiens.

Nos expériences confirmées données pour le sérum tel quel. Mais le sérum, de même que l'albumine d'œuf, peut produire l'effet dit des propeptones, à la condition que ces protéines, tout comme leurs produits d'hydrolyse soient accompagnés de leucine, laquelle agit comme intermédiaire obligé entre la protéine et l'organisme.

Avec les protéines non dénaturées, l'augmentation de la coagulabilité du sang et la chute de la pression ne sont pas suivies d'une diminution de la coagulabilité du sang. Or il est établi que la chute de la pression, l'accélération du pouls, la diminution de l'amplitude de pulsations expriment un effet vasodilatateur; et il ressort des travaux de Nolf que cette vasodilatation serait due à des coagulations sur l'endothélium vasculaire sous l'influence d'une substance thromboplastique qui dans l'espèce serait la protéine injectée.

Il résulte de nos expériences que c'est cette action thromboplastique qui a comme intermédiaire obligé la leucine. Nos expériences d'injection de peptone chez le lapin nous fourniront l'occasion de revenir avec plus de détails sur ce point.

Le second effet de propeptones, l'incoagulabilité du sang, est attribué assez unanimement à la sécrétion d'antithrombine, on conçoit que ces deux effets soient séparables. Cette question aussi sera reprise plus loin.

#### Bibliographie.

- Nolf, La composition protéique du milieu humoral. Arch. internat. de Physiologie, T. 9, T. 10, 1910.  
— Réaction du chien à l'injection intra-veineuse des albuminoïdes de son sérum. Arch. internat. de Physiologie, T. 1, 1904.

## Chapitre IV.

**Les conditions de l'intoxication propeptonique chez le lapin.  
L'intervention obligée des acides aminés et du complément.**

Les traités de physiologie disent que les injections de peptone au lapin ne produisent pas les effets connus chez le chien (il en serait de même pour le cobaye, Werbitzky).

Nolf s'occupa plus spécialement de la question: il essaya même des doses énormes, sans obtenir de résultats satisfaisants; il fit de plus la constatation intéressante que ces injections de peptones ne provoquent pas la sécrétion d'anti-thrombine au niveau des vaisseaux sanguins hépatiques, phénomène dont il avait montré toute l'intensité et l'importance chez le chien. Gley put observer un certain retard dans la coagulation du sang chez le lapin, après de fortes doses de peptone. Doyon, Morel et Policard estiment le lapin réfractaire aux injections de propeptones et ne purent extraire de substances anticoagulantes du foie des lapins injectés. Dans son travail sur la toxicité comparée des dérivés de destruction des albumines, Roger figure des tracés obtenus chez le lapin; ils indiquent des chutes de la pression, mais il faut remarquer qu'elles ne sont pas obtenues avec la peptone de Witte ni avec des produits similaires, si actifs chez le chien; il emploie des corps moins définis, résultant de l'autodigestion du foie ou de muscles du lapin, et ses injections sont lentes et prolongées.

Le problème n'est donc pas résolu: la peptone de Witte n'est pas active chez le lapin dans les conditions où elle l'est chez le chien.

**I. Peptone de Witte.**

Nous n'insisterons pas sur les expériences de contrôle que nous avons faites avec la peptone de Witte: elles confirment les résultats que nous venons de rappeler.

Remarquons que dans nos expériences nous nous tiendrons à la dose de 0.10 g par kg d'animal. Cette dose relativement faible est toujours active chez le chien; de cette façon nos résultats restent parfaitement comparables à ce que l'on connaît pour le chien.

Les lapins pèsent tous approximativement 2 kg.

### A. Addition de leucine.

Depuis que nous avons établi l'influence que la proportion de leucine peut avoir, une expérience s'indiquait: il se pouvait que pour le lapin la quantité de leucine dût être plus forte. L'hypothèse ne se vérifie pas: la peptone n'est pas rendue plus active ainsi.

1. Lapin de 1750 g, reçoit 0.17 g de peptone de Witte additionnés de 0.1 g de leucine.

La pression sanguine, qui est de 44 mm, subit du fait de l'injection quelques oscillations, mais reste à la même hauteur.

### B. Addition de sérum.

Bien que par l'adjonction d'une quantité plus ou moins forte de leucine la peptone de Witte ne devienne pas active chez le lapin, il doit cependant exister des conditions qui rendent cette peptone toxique, puisque ces conditions se trouvent réalisées quand on anaphylactise le lapin à la peptone (nous y reviendrons au chapitre V de notre travail).

Or on sait par les travaux de Sleeswijk et de Friedberger qu'au moment du choc anaphylactique il se fait une grande consommation de complément. Sans intervenir ici dans la discussion de savoir si le complément existe à l'état libre dans le plasma sanguin, nous nous sommes demandé si l'enrichissement de l'organisme en complément ou l'addition de complément sous la forme de sérum frais du lapin ou d'un autre animal, n'aurait pas réuni d'un coup les conditions dans lesquelles la peptone est active.

Le sérum frais est recueilli environ 3 heures avant les expériences.

Nous verrons d'abord ce que produit l'addition de complément seul, puis l'addition simultanée de leucine et de complément.

2. Lapin de 2 kg, reçoit 0.2 g de peptone de Witte dans 4 cc. de liquide physiologique, additionnés de 4 cc. de sérum de lapin normal frais.

Pression carotidienne 48 mm. Coagulation en 30 min.

5 sec. après l'injection, la pression est 45 mm

1 $\frac{1}{2}$  min. " " " " " 49 " coag. en 14 min.

6 " idem

2<sup>e</sup> injection de 0.2 g de peptone seule:

10 sec. après, la pression est passagèrement 45 mm

1 min. " " " " " 48 " coag. en 30 min.

Zeitschr. f. Immunitätsforschung. Orig. Bd. XIII.

### C. Addition simultanée de leucine et de sérum-complément.

La leucine est émulsionnée comme précédemment à l'aide d'une minime quantité de bile.

L'injection se fait à la seringue, généralement en 5 secondes.

3. Lapin de 2 kg, reçoit 0.2 g de peptone de Witte, additionnés de 0.08 de leucine et de 4 cc. de sérum de lapin normal frais le tout en 10 cc.; comme 2<sup>e</sup> et 3<sup>e</sup> injection, 0.2 g de peptone seule.

Pression 54 mm, coagulation en 7 min.

15 sec. après, pression 44 mm

1 min. " " 38 "

3 " " " 52 " coag. en 2 heures

6 " idem.

2<sup>e</sup> injection :

30 sec. après, pression 28 mm

1 min. " " 20 "

2 " " " 22 " puis remonte insensiblement

4. Lapin de 2 kg, reçoit 0.2 g de peptone de Witte additionnés de 0.5 g de leucine et de 4 cc. de sérum-complément.

Pression 48 mm, coagulation en 15 min.

10 sec. après, pression 35 mm puis remonte peu à peu.

5 min. " " 47 " " " 1 heure

8 " idem

2<sup>e</sup> injection :

20 sec. après, pression 18 mm

1 1/2 min. " " 24 " coag. en 10 min.

5. Lapin de 2 kg, reçoit 0.2 g de peptone de Witte additionnés de 0.5 g de leucine et de 2.5 cc. sérum-complément.

Pression 46 mm, coagulation en 30 min. Injection, aussitôt chute.

1 min. après, pression 8 mm

2 " " " 10 " sang incoagulable

10 " " " 26 " coag. en 55 min.

6. Lapin de 2 kg, reçoit 0.2 g de peptone de Witte additionnés de 0.25 g de leucine et de 2 cc. de sérum-complément.

Pression 63 mm, coagulation en 9 min.

1 min. après, pression 58 mm

2 " " " 57 " coag. en 20 min.

8 " idem

2<sup>e</sup> injection, aussitôt chute brusque:

15 sec. après, pression 18 mm

1 1/2 min. " l'animal succombe, le sang est incoagulable.

7. Lapin de 2.4 kg, reçoit 0.6 g de peptone de Witte additionnés de 0.05 g de leucine et de 3 cc. de sérum-complément.

Pression 67 mm, coagulation en 7 min. Injection: aussitôt débute une chute intense.

10 sec. après, pression 29 mm, quelques convulsions

25 " " la pression commence à remonter

1 min. " Pression 55 mm

1 1/2 " " " 57 " coag. en 9 min.

8 " " " 56 " " " 32 "

2<sup>e</sup> injection (0.8 g de peptone seule): aussitôt chute

10 sec. après, pression 22 mm

25 " " l'animal succombe.

Ainsi, l'adjonction de leucine seule ou de sérum-complément seul ne rendent pas la peptone de Witte active chez le lapin; mais l'addition simultanée des deux réunit les conditions nécessaires à son activité.

La chute est nette dans tous les cas: déjà avec 0.1 g de peptone par kg d'animal; elle est intense avec la dose de 0.25 g par kg.

Après quelques minutes le sang devient moins coagulable, parfois incoagulable. Il y a donc sécrétion d'antithrombine. Toutefois, cette sécrétion est bien moindre que chez le chien, et l'immunité ne se manifeste pas nettement. Même si la première injection a produit peu d'effet, la seconde peut traduire une activité exagérée: il semble que la première réaction, surtout quand elle a été faible ou traînante, met du complément en liberté et favorise ainsi les effets de la seconde.

Après une première injection qui a provoqué une réaction caractéristique, la seconde paraît épuiser rapidement l'antithrombine sécrétée; quand la sécrétion d'antithrombine n'a pas été abondante, on peut voir peu après la seconde injection l'action thromboplastique de la peptone prendre le dessus et le sang redevenir plus coagulable.

#### D. Addition de sérum vieux ou de sérum chauffé à 58° C.

11. Lapin de 2.5 kg, reçoit 0.25 cc. de peptone de Witte additionnés de 0.05 g de leucine et de 4 cc. de sérum de lapin normal frais, chauffé préalablement à 58° C.

Pression 55 mm, coagulation en 20 min. L'injection produit une légère et courte chute à 44 mm, mais

10 sec. après, la pression est de nouveau normale

2 min. " pression 54 mm, coag. en 21 min.

6 " " idem.

2<sup>e</sup> injection (0.25 g de peptone seule): pas d'effet

2 min. après, pression 54 mm, coag. en 25 min.

12. Lapin de 2.5 kg, reçoit 0.25 g de peptone de Witte additionnés de 0.075 g de leucine et de 4 cc. de sérum de cheval datant de 2 ans.

Pression 60 mm, coagulation en 11 min. L'injection produit quelques oscillations entre 56 et 58 mm.

4 min. après, pression 58 mm, coag. en 10 min.

8 " " idem

2<sup>e</sup> injection qui reste tout à fait sans effet:

4 min. après: Pression 61, coag. en 5 min.

En somme, quand le sérum que l'on ajoute à la peptone est vieux ou bien préalablement chauffé à 58° C, c'est-à-dire qu'il est dépourvu de complément, les résultats de ces injections sont identiques à ceux d'une injection de peptone simplement additionnée de leucine. Un sérum privé de complément est inactif.

#### E. Enrichissement du sérum en complément.

On sait par des expériences de Mlle. Fassin, confirmées depuis, qu'en injectant de la thyroïdine sous la peau à un lapin, le sérum recueilli 24 heures après est plus riche en complément qu'antérieurement. Remarquons cependant qu'il n'est pas démontré par là qu'il y a augmentation de complément dans le sang circulant.

Bien que l'expérience suivante ait été faite avec du blanc d'œuf (voir plus loin), nous la plaçons ici, parce qu'elle complète nos données sur l'intervention du sérum-complément.

13. Lapin de 2 kg, reçoit 0.3 g de poudre de glande thyroïde de (Merck) sous la peau et est remis en expérience après 24 heure. A ce moment on lui injecte 5 cc. de blanc d'œuf au  $\frac{1}{4}$ , plus 0.25 g de leucine.

Pression 60 mm, coagulation en 20 min. L'injection ne modifie pas la courbe.

2 min. après, coag. en 34 min.

5 " " " " 34 "

10 " " " " 34 "

Par contre, comme 2<sup>e</sup> injection, on donne au lapin 5 cc. de blanc d'œuf au  $\frac{1}{4}$  additionnés de 0.25 g de leucine et de 3 cc. de sérum-complément. Aussitôt chute nette.

1 min. après, pression 37 mm

2 " " " " 33 "

3 " " " " 39 " coag. en 1 $\frac{1}{2}$  heure

Ainsi donc une injection de thyroïdine capable d'enrichir le sérum du lapin en complément, ne correspond pas à l'injection de sérum-complément dans le plasma au moment de l'expérience, et n'active pas une injection de protéine et de leucine.

**F. La lécithine ne peut pas remplacer le complément.**

14. Lapin de 2 kg, reçoit 5 cc. de blanc d'œuf au  $\frac{1}{8}$ , additionnés de 0.1 g de leucine et de 0.1 de lécithine (Merck).

Pression 50 mm, coagulation en 25 min. L'injection ne modifie pas la courbe.

3 min après, coag. en 28 min.

Une 2<sup>e</sup> injection reste également sans effet.

10 min. après, coag. en 1 heure.

**II. Blanc d'œuf.**

Nous avons vu que chez le chien, non seulement la peptone, mais aussi toute protéine peut à des degrés divers provoquer les phénomènes de l'intoxication propeptonée. Une fois déterminées les conditions dans lesquelles nous sommes parvenu à rendre la peptone active chez le lapin, il y avait lieu de vérifier si les résultats seraient les mêmes avec une autre protéine. Nous avons employé l'albumine d'œufs frais, diluée au  $\frac{1}{8}$  dans du liquide physiologique, et à la dose moyenne de 2.5 cc. du mélange par kg d'animal, ce qui correspond à 0.12 g de protéine.

15. Lapin de 2 kg, reçoit 5 cc. de blanc d'œuf au  $\frac{1}{8}$ , deux fois successivement.

Pression 57 mm, coagulation en 1 heure. L'injection ne modifie pas la courbe.

4 min. après, coag. en 38 min.

5 " " idem

2<sup>e</sup> injection, également sans effet.

3 min. après, coag. en 11 min.

8 " " " " 4 "

16. Lapin de 2 kg, reçoit 5 cc. de blanc d'œuf au  $\frac{1}{8}$  additionnés de 0.1 g de leucine; la seconde injection est pareille, la troisième ne renferme pas de leucine.

Pression 55 mm, coagulation en 30 min. L'injection ne modifie pas la courbe sphymographique.

4 min. après, coag. en 30 min.

2<sup>e</sup> injection:

15 sec. après débute une chute.

1 min. après, pression 40 mm

3 " " " 45 " coag. en 8 min.

6 " " " 45 " " " 3 "

21 " " " 45 " " " 45 "

3<sup>e</sup> injection:

20 sec. après, pression 30 mm

50 " " " 40 "

**17.** Lapin de 2 kg, reçoit 5 cc. de blanc d'œuf au  $\frac{1}{3}$  additionnés de 2.5 cc. de sérum-complément de lapin.

Pression 68 mm, coagulation en 28 min.

20 sec. après, chute très courte et passagère à 56 mm.

40 sec. après, pression 65 mm

5 min. „ „ 65 „ coag. en 27 min.

2<sup>e</sup> injection :

3 min. après, Pression 65 mm coag. en 24 min.

16 „ „ „ 65 „ „ „ 7 „

**18.** Lapin de 2 kg, reçoit 5 cc. de blanc d'œuf au  $\frac{1}{3}$  additionnés de 0.1 g de leucine et de 2.5 cc. de sérum-complément; la troisième injection ne comporte que 5 cc. de blanc d'œuf seul.

Pression 63 mm, coagulation en 6 min.

5 sec. après, chute de pression

20 sec. après, pression 42 mm

3 min. „ „ 54 „ coag. en 24 min.

6 „ „ „ 60 „ „ „ 20 „

7 „ „ idem

2<sup>e</sup> injection :

5 sec. après chute

15 sec. après, pression 40 mm

2 min. „ „ 54 „ coag. en 21 min.

8 „ „ „ 56 „ incoagulable

21 „ „ „ 61 „

3<sup>e</sup> injection : pas de modifications du tracé.

4 min. après, pression 60 mm coag. en 29 min.

12 „ „ „ 64 „ „ „ 38 „

**19.** Lapin de 2 kg, reçoit 5 cc. de blanc d'œuf au  $\frac{1}{3}$  additionnés de 0.1 g de leucine et de 5 cc. de sérum de cheval, datant de plusieurs mois.

Pression 61 mm, coagulation en 30 min. L'injection est suivie de quelques oscillations, dont une à 50 mm.

10 min. après, pression 60 mm, coag. en 6 min.

**20.** Lapin de 2 kg, reçoit 5 cc. de blanc d'œuf au  $\frac{1}{3}$  additionnés de 0.1 g de leucine et de 5 cc. de sérum de lapin normal, mais recueilli depuis 36 heures.

Pression 54 mm, coagulation en 30 min. L'injection ne modifie pas la courbe.

1 min. après : coag. en 31 min.

8 „ „ „ „ 15 „

2<sup>e</sup> injection identique à la première :

25 sec. après débute une chute

1 min. après, pression 21 mm, coag. en 3 heures

10 „ „ „ 25 „ „ „ 40 min.

**21.** Lapin de 2 kg, reçoit 2.5 cc. de sérum de lapin normal frais dans la jugulaire, puis 4 min. après, 5 cc. de blanc d'œuf au  $\frac{1}{3}$  additionnés de 0.1 g de leucine.



Pression 42 mm, coagulation en 30 min. L'injection détermine une chute rapide.

15 sec. après: pression 26 mm

1 $\frac{1}{2}$  min. " " 40 " coag. en 37 min.

4 " " " 40 " " " 20 "

2<sup>e</sup> injection: la courbe n'est pas modifiée.

2 min après: Pression 50 mm, coag. en 5 min.

Chez le lapin comme chez le chien, l'injection intraveineuse d'albumine d'œuf est sans effet sur la pression sanguine, mais on observe que la coagulabilité du sang est peu à peu augmentée.

L'addition de leucine, qui rend le blanc d'œuf actif chez le chien, ne suffit pas chez le lapin; cependant ici encore la coagulabilité du sang est renforcée. Mais tandis qu'une première injection est inactive, une seconde injection agit: comme pour la peptone de Witte, la première injection paraît mettre en liberté une certaine quantité du facteur indispensable pour que l'intoxication protéinique se produise avec toutes ses manifestations.

Ce facteur auquel nous venons de faire allusion est comme pour la peptone de Witte la présence du sérum-complément. En ajoutant au blanc d'œuf de la leucine et du sérum-complément, l'intoxication est immédiate et forte: chute de la pression, coagulabilité du sang d'abord augmentée, puis ralentie parfois jusqu'à l'incoagulabilité; à ce moment il y a immunité. Une nouvelle injection épuise en général la petite provision d'antithrombine sécrétée, et la coagulabilité du sang redevient moins lente.

Les expériences de contrôle montrent que c'est bien à l'intervention de cette partie du sérum qu'en bactériologie on a désignée sous le nom de complément qu'est due l'activation des protéines-leucines: un sérum chauffé à 58° C (où le complément est détruit), un sérum âgé de plus de 24 heures, ou datant de plusieurs mois (d'où le complément a disparu) sont tous incapables d'intervenir dans l'intoxication protéinique. Une injection de sérum-complément qui précède de plusieurs minutes celle de la protéine n'est guère efficace.

### III. Peptone de gluten.

Jusqu'ici nous avons employé chez le lapin des protéines qui n'entrent pas dans le groupe de celles auxquelles cet

animal, contrairement au chien, soit habitué de par son alimentation.

Nous avons voulu compléter ces expériences chez le lapin en recourant à une protéine végétale, se rapprochant par conséquent davantage de celles auxquelles l'organisme du lapin est accoutumé. Nous avons préparé une peptone de gluten de froment de la façon suivante: environ 200 g de gluten humide (correspondant à 15 g de produit sec) sont mis dans un flacon avec 200 g d'acide chlorhydrique à 6 ‰ dans du liquide physiologique, et laissés pendant 24 heures à 37° C. Le produit obtenu est stérilisé et analysé d'après la méthode indiquée plus haut (voir 2<sup>e</sup> partie de notre travail).

Nous devons les résultats de cette analyse à l'obligeance de notre ami le Dr. A. J. J. Vandeveld.

Dans 100 cc. du liquide il y a, exprimé en g d'azote:

albumines coagulables	0.0406
albumoses	0.3992
peptones	0
acides aminés	0.3204
Total	0.7602

Le produit contient surtout des albumoses et une quantité assez notable d'acides aminés; il ressemble à ce point de vue à la peptone commerciale que nous avons employée sous le nom de syntonine Merck (2<sup>e</sup> partie de ce travail). Pour l'injection on lui laisse une acidité correspondant à celle de la peptone de Witte.

Comme pour cette dernière, on peut neutraliser exactement, à condition d'ajouter après cela la dose voulue de leucine (lapin 24).

22. Lapin de 2 kg, reçoit 10 cc. de peptone-gluten, correspondant à 0.47 g de protéine, soit 0.23 g par kg d'animal; deux fois successivement.

Après chaque injection il y a une oscillation de la courbe et chaque fois la coagulabilité du sang est un peu augmentée.

23. Lapin de 2 kg, reçoit 8 cc. de peptone-gluten additionnés de 0.1 g de leucine.

Pression 77 mm, Coag. en 7 min.

30 sec. après débute une chute.

1 min. après: Pression 37 mm

2 " " " 38 " Coag. en 21 min.

5 " " " 42 " " " 9 "

24. Lapin de 2 kg, reçoit 6 cc. de peptone-gluten neutralisée exactement, puis additionnée de 0.1 de leucine.

Pression 62 mm, coag. en 28 min.

30 sec. après débute une chute.

1 min. après : Pression 35 mm Coag. en 24 min.

3 " " " 38 " " " 2 "

Coagulation dans le manomètre.

25. Lapin de 2 kg, reçoit 6 cc. de peptone-gluten additionnés de 0.1 g de leucine et de 2.5 cc. de sérum-complément de lapin.

Pression 57 mm, coag. en 17 min. Injection, aussitôt chute intense.

45 sec. après, pression 22 mm, convulsions.

2 min. après, l'animal succombe.

Remarquons que le chien est moins sensible que le lapin à notre peptone-gluten.

118. Chien, femelle, de 8 kg, reçoit 50 cc. du produit, soit 4.72 g de protéines ou 0.55 g par kg d'animal.

Pression 36 mm, pouls 54, amplitude 30 mm. Coag. en 18 min.

Injection en 12 sec.

20 sec. après : Pression 55 mm Pouls 136 Ampl. 10 mm

40 " " " 35 " " 120 " 7 "

1 min. " " 35 " " — " — "

1 1/2 " " " 38 " " 114 " 7 "

Coag. de 15—24 hrs.

Notre peptone-gluten, qui est composée surtout d'albumoses donne donc chez le chien une courbe qui correspond assez bien avec celles que nous avons observées avec les peptones commerciales à grande teneur d'albumoses, et qui ont été décrites aussi entretemps par Zuntz.

Chez le lapin l'injection de notre peptone-gluten donne des résultats tout à fait comparables à ceux qui s'obtiennent chez le chien avec des protéines riches en albumoses telle la syntonine Merck (voir plus haut au 2<sup>e</sup> chapitre).

Pour que le produit soit actif, il faut qu'il soit accompagné d'une assez notable proportion d'acides aminés. L'action thromboplastique prédomine.

Mais l'intérêt spécial de ces dernières expériences réside avant tout dans le fait que cette protéine végétale, qui se rapproche de celles auxquelles le lapin est habitué, n'exige pas l'addition de sérum-complément. Il semble y avoir dans le plasma le complément nécessaire ou plus probablement le peu de complément qui s'y trouve a une affinité plus grande pour ce genre d'albumines que pour les protéines d'origine animale.

L'adjonction supplémentaire de sérum-complément (lapin 25) donne à cette peptone-gluten des effets foudroyants.

### Résumé.

Le rôle d'intermédiaire obligé que nous avons reconnu aux acides aminés dans les expériences chez le chien, ne paraît donc pas revenir à la leucine telle quelle. Elle doit trouver à se combiner avec un élément qui se trouve en certaine quantité dans le sang, quand il s'agit de protéines auxquelles l'animal est habitué ou dont il se nourrit, mais qui ne s'y trouve pas ou n'accuse que peu d'activité, quand ce sont d'autres albumines.

Cet élément est tout ou partie du «complément» tel qu'on l'a conçu en bactériologie.

On peut se figurer que l'élément complément du groupement intermédiaire leucine-complément ne doit pas être préformé en grande quantité. Il suffit qu'il s'en trouve assez pour que l'action thromboplastique puisse débiter; ces premières traces de coagulation mettent en liberté au fur et à mesure qu'elles se font, le complément nécessaire à la coagulation progressive. Faute d'une affinité suffisante, une protéine tout à fait étrangère, même munie de leucine, se combine bien moins vite au complément présent et en met fort peu et fort lentement en liberté bref le phénomène est faible et extrêmement lent.

Le lapin sécrète l'antithrombine plus lentement et surtout moins abondamment que le chien. Cette sécrétion est exprimée par les retards dans la coagulabilité, qui va exceptionnellement jusqu'à l'incoagulabilité, et par l'immunité propeptonique ou mieux protéinique plus ou moins accusée.

### Bibliographie.

- Nolf, Des injections intraveineuses de propeptone chez le chien. Arch. intern. de Physiol., T. 3, 1905.  
Arthus, La séroanaphylaxie du lapin. Arch. intern. de Physiol., T. 7, 1909.  
Roger, Sur la toxicité comparée des dérivés de destruction des albumines. Journ. de Physiol. et de Path. exp., 1910.  
Gley, Action de la propeptone sur la coagulabilité du sang chez le lapin. C. R. Soc. de Biol., Paris 1896, No. 48.  
Doyon, Policard et Morel, C. R. Soc. de Biol. Paris, 18 mars 1911 et No. 24, 1911.  
Fassin, Influence de l'inoculation d'extraits thyroïdiens sur les propriétés actives du sérum. C. R. Soc. de Biol. Paris, 9 mars 1907.  
Wertizky, C. R. Soc. de Biol., 26 juin 1909.

## Chapitre V.

### L'anaphylaxie et ses rapports avec les acides aminés.

#### Aperçu bibliographique.

Le travail de Rosenau et Anderson sur l'anaphylaxie sérique fut publié au moment où l'on commençait à s'intéresser plus particulièrement aux phénomènes d'hypersensibilité. Il vint préciser des faits déjà entrevus par Theobald Smith, par Otto et par Arthus.

Peu après, dans des expériences publiées en 1907, nous avons établi le rapprochement entre ces phénomènes et ceux de l'intoxication propeptonique: nous nous basions sur la constatation que le sérum injecté dans le péritoine d'un cobaye présente bientôt la réaction du biuret, c'est-à-dire qu'il se peptonise, et que cette transformation est plus rapide et plus intense chez l'animal en état d'anaphylaxie.

Entretiens d'autres théories étaient nées, cherchant à combiner des rapports entre les faits observés, et à les exprimer d'une façon algébrique pourrait-on dire, en désignant par des concepts les différentes propriétés que l'on parvenait à différencier. Richet estimait qu'une première injection provoquait la formation d'une toxogénine, laquelle, à une injection suivante, transformerait brusquement le produit injecté en une modification fortement toxique. Richet, l'auteur du nom „anaphylaxie“, avait surtout en vue des toxalbumines qu'il tirait d'actinies, et dont la propriété saillante était précisément la toxicité.

Besredka s'occupa plutôt de l'anaphylaxie sérique; il envisagea le problème à peu près comme Richet, mais comme le sérum n'est nullement toxique par lui-même, il préféra le nom de sensibilisine à celui de toxogénine, le sérum étant la substance sensibilisinogène.

Plus tard il trouva que le sérum chauffé est encore sensibilisinogène, mais ne se combine plus à la sensibilisine lors de l'injection d'épreuve. Il divisa alors le sensibilisinogène en deux parties. L'une thermostable, resta appelée sensibilisinogène; l'autre thermolabile, il la désigna du nom d'antisensibilisine, parce qu'elle se combine avec la sensibilisine partout où elle la rencontre. La sensibilisine qui se développe dans le corps

après une injection de sensibilisinogène (sérum ou protéine) se fixerait sur les tissus et spécialement sur le système nerveux. Au moment d'une injection d'épreuve, la rencontre de l'anti-sensibilisine (partie thermolabile du sérum) avec la sensibilisine injectée provoque les manifestations foudroyantes du choc anaphylactique, il y a antianaphylaxie aussi longtemps que toute la provision de sensibilisine est saturée et qu'il n'y en a pas de reformée.

Plusieurs d'auteurs essayent de rattacher cette nouvelle fonction à d'autres, déjà connues par l'étude de l'immunité et plus particulièrement aux agglutinines et aux précipitines.

Bien que v. Pirquet, dans son livre sur la «maladie du sérum», ait exprimé l'opinion que les délais ne concordent pas suffisamment pour admettre que l'anaphylaxie ou allergie ait rien de commun avec la présence de précipitine dans l'organisme, Friedberger estime que la sensibilisine de Besredka et la précipitine sont choses identiques et que le phénomène de l'anaphylaxie est l'expression de précipitations au niveau des cellules. Sleeswijk, au laboratoire de Bordet, montra qu'il y a, au moment du choc anaphylactique, une grande consommation de complément, fait confirmé par Friedberger et Hartoch.

Friedberger, après avoir soutenu que l'anaphylaxie est cellulaire, admet qu'elle peut être aussi humorale. Pour-suivant ses recherches sur l'absorption du complément, il prétendit que l'on peut obtenir, en mélangeant *in vitro* une protéine, l'anticorps correspondant, et du complément, un produit toxique d'emblée et qui donne à l'injection des phénomènes tout à fait analogues à ceux du choc anaphylactique.

En 1909, donc deux ans après la publication de notre travail cité plus haut, Biedl et Kraus reprirent la voie que nous avions indiquée et étudièrent l'anaphylaxie du chien vis à vis de la peptone de Witte, entre autres au moyen d'observations au sphygmographe. Ils arrivent à confirmer la conclusion que nous avions énoncée; l'anaphylaxie est identique à une intoxication propeptonique. Dès lors il semble qu'ils pouvaient admettre ce qui avait été dit par des physiologistes, entre autres par Nolf: la chute de la pression sanguine est due à une vasodilatation provoquée par des coagulations

pariétales sur les endothélia, spécialement au niveau des poumons, et non à une action sur les centres nerveux vasomoteurs. Ce fait fut d'ailleurs confirmé par divers auteurs au point de vue spécial du choc anaphylactique chez le cobaye.

Toutefois ces auteurs rattachent l'action de la peptone sur les vaisseaux à une substance hypothétique qui serait contenue dans la peptone et que Popielsky avait appelée la „vasodilatine“. Ils expliquent l'anaphylaxie par la production particulièrement rapide et intense, au dépens de la protéine injectée, d'une vasodilatine qui constituerait le poison anaphylactique; ils s'en expliquent la formation d'après la conception de Richet: à la suite d'une première injection, il naît dans l'organisme une protoxine, qui caractérise l'état d'anaphylaxie; c'est cette protoxine qui, au moment d'une nouvelle injection de protéine, favorise la formation de toxine-vasodilatine. Cette protoxine ou sensibilisine ne serait pas identique à la précipitine, comme le prétend Friedberger.

L'antianaphylaxie resterait due à l'épuisement de l'organisme en sensibilisine et serait l'analogue (ici encore ces auteurs confirment les conclusions de mon travail de 1907) à ce qu'on a appelé l'immunité propeptonique. De là les moyens pratiques prônés par Besredka de prévenir en médecine humaine les accidents anaphylactiques, par des injections subintrantes de petites quantités de sérum (insuffisantes pour provoquer un choc, mais suffisantes pour conférer une immunité propeptonique passagère) peu avant de faire l'injection massive d'épreuve.

L'anaphylaxie serait alors due à des produits de désintégration des protéines, soit peptones, soit vasodilatine, soit autre chose.

Enfin d'autres auteurs, envisagèrent la question d'un point de vue encore plus large; de multiples substances, même les produits de désintégration des albumines de l'animal lui-même, peuvent anaphylactiser. Ils ne veulent plus reconnaître les phénomènes toxiques comme l'essence même du phénomène: ils étendent le problème et le considèrent comme relevant autant de la physiologie que de la pathologie. Ils y entrevoient un processus général qui pourrait bien avoir des rapports avec la nutrition et la désassimilation. La

physiologie nous éclaire peu dans ce domaine, mais l'étude de l'anaphylaxie pourrait nous y aider (Weichardt et Nolf).

Weichardt voit un rapprochement entre les substances toxiques qui donnent le choc anaphylactique et les substances kénotoxiques (résultant de la désassimilation par fatigue) à l'étude desquelles il s'est consacré. Même des produits de désassimilation qu'il réussit à préparer *in vitro* donnent des manifestations apparentées à celles de l'anaphylaxie.

Nolf a surtout en vue les phénomènes généraux de la nutrition. Le choc anaphylactique ou l'intoxication propeptonique agiraient de la façon suivante: «l'antigène du sérum se coagule en compagnie d'une partie des albumines du plasma, à la surface des endothelia vasculaires. Cette coagulation est le résultat d'une affinité spéciale pour l'antigène qu'ont acquises, au cours de la vaccination les endothelia et les albumines humores produites par eux. L'anaphylaxie et l'immunité ne sont que deux aspects différents d'une même transformation de l'organisme vacciné. Elles sont des manifestations caractéristiques du processus fondamental suivant lequel sont produites et consommées les albumines humores normales, destinées à la nutrition des tissus.»

On sait que l'on peut anaphylactiser le chien vis-à-vis des protéines les plus diverses. Nous ne mettrons en expérience que ceux des produits déjà employés plus haut et qui sont inactifs par eux-mêmes chez le chien afin de rendre le contraste du phénomène plus frappant.

81. Chien de 5 kg, reçoit sous la peau 0.10 g de syntonine Merck (albumoses, voir à la 2<sup>e</sup> partie du travail); puis 15 jours après, dans la jugulaire 0.25 g du même produit. Cette dose est absolument inoffensive chez un chien neuf: cf. chiens No. 53, 54, 55, 56, 57.

Pression 48 mm, pouls 50, amplitude 15 mm. Injection en 9 sec., aussitôt chute de la pression.

40 sec. après:	Pression 30 mm	Pouls 130	Ampl. 2 mm
2 min. „	„ 48 „	„ 60 „	15 „ coag. en 7 min.

82. Chien de 6 kg, reçoit par voie sous-cutanée 0.10 g de syntonine Merck, puis 15 jours après il reçoit 0.25 g du même produit additionnés de 0.40 g de leucine.

Pression 53 mm, pouls 55, amplitude 25 mm. Injection en 6 sec., aussitôt chute brusque, l'animal s'agite, crie et succombe 1 min. après l'injection.



**30.** Lapin de 2 kg, reçoit 0.5 cc. de la solution de peptone-gluten dans la veine de l'oreille; puis 2 jours après il reçoit dans la jugulaire 10 cc. de la même solution, dose à laquelle un lapin neuf n'est que peu sensible. (Cf. lapins 22, 23, 24, 25.)

Pression 60 mm, aussitôt la pression baisse rapidement.

25 sec. après: Pression 22 mm

30 „ „ l'animal succombe.

**83.** Chien de 8 kg, reçoit en injection sous-cutanée 5 ccm de blanc d'œuf au  $\frac{1}{8}$ ; puis 20 jours après il reçoit dans la jugulaire 40 cc. de blanc d'œuf au  $\frac{1}{8}$  additionnés de 0.4 g de leucine.

Pression 47 mm, pouls 52, amplitude 22 mm, coag. en 10 min. Injection en 14 sec.

35 sec. après: Pression — mm Pouls 90 Ampl. — mm

45 „ „ „ 18 „ „ 36 „ 8 „ sang. incoagul.

6 min. „ l'animal se remet un peu. Coag. en 6 min.

Outre que ces premières expériences confirment les données connues quant à la possibilité d'anaphylactiser le chien vis-à-vis de toutes les protéines, on constate de plus un fait nouveau extrêmement important: si au moment de l'épreuve anaphylactique on ajoute au produit à injecter de la leucine l'effet en est considérablement accru.

Chez le lapin la peptone de Witte est inactive par elle-même (voir la 4<sup>e</sup> partie du travail); nous commençons donc nos expériences sur l'anaphylaxie du lapin avec la peptone de Witte. Par voie intraveineuse l'anaphylaxie est plus rapidement obtenue que par voie sous-cutanée: nos lapins reçoivent en général 0.1 g de peptone comme injection préparatoire dans la veine de l'oreille et déjà 24 ou 48 heures après 0.2 g de peptone comme injection d'épreuve, réunissant ainsi la dose minima à laquelle un lapin préparé est sensible et un minimum de délai.

### I. Anaphylaxie active.

Dans un travail sur le sort de protéines et des peptones injectées au lapin, nous avons pu voir que la période d'excrétion exagérée d'azote qui suit l'ingestion d'ovalbumine est trois ou quatre fois plus longue que celle qui suit l'administration de peptone; il n'est donc pas étonnant que déjà 24 heures après une injection intraveineuse de peptone de Witte le lapin se trouve en état d'anaphylaxie pour cette substance. Après 48 heures aussi l'anaphylaxie est intense.

Ce sont ces délais que nous avons adoptés pour nos essais. Afin de ne pas allonger inutilement les protocoles d'expériences, nous laisserons de côté les répétitions d'expériences qui seraient absolument conformes à la première.

**31.** Lapin de 2 kg, reçoit dans la veine de l'oreille 0.1 g de peptone de Witte, et 24 heures après 0.2 g du même produit dans la jugulaire, deux fois successivement.

Pression 50 mm, coag. en 17 min.

10 sec. après: Pression 36 mm

30 " " " 48 "

1 $\frac{1}{2}$  min. " " 25 "

3 $\frac{1}{2}$  " " " 40 "

2° injection:

1 min. après: Pression 13 mm

1 $\frac{1}{2}$  " " " 16 " coag. en 25 min.

la pression remonte lentement et progressivement.

**33.** Lapin de 3 kg, reçoit 0.1 g de peptone de Witte dans la veine auriculaire, puis 24 heures après, dans la jugulaire, 0.4 g de peptone additionnés de 4 cc. de sérum-complément de lapin.

Pression 68 mm, coagulation en 18 min. Injection: aussitôt chute rapide.

25 sec. après: Pression 44 mm

1 $\frac{1}{4}$  min. " " 71 "

2 " " " 70 " coag. en 1 heure

10 " " " 67 " " " 1 "

**36.** Lapin de 2 kg, reçoit 0.1 g de peptone dans la veine de l'oreille, puis 24 heures après 0.25 g de peptone de Witte dans la jugulaire, additionnés de 2 cc. sérum-complément de lapin.

Pression 48 mm, coagulation en 30 min. Injection: aussitôt quelques oscillations.

30 sec. après: Pression 33 mm

40 " " " 35 " coag. en 25 min.

4 min. " " 42 " " " 5 "

6 " " " 37 " " " "

10 " " " 49 " " " 3 heures

**37.** Lapin de 2,5 kg, reçoit 0.1 g de peptone de Witte dans la veine de l'oreille, puis 48 heures après 0.25 g de la même peptone, additionnés de 2.5 cc. de sérum-complément de lapin.

Pression 45 mm, coagulation en 30 min. Injection.

20 sec. après: Pression 25 mm

3 min. " " 40 " incoagulable

10 " " " 42 " coag. en 12 min.

**38.** Lapin de 2.5 kg, reçoit 0.1 g de peptone de Witte dans la veine de l'oreille, puis 48 heures après 0.2 g du même produit, additionnés de 3 cc. de sérum-complément de lapin, dans la jugulaire.

Pression 45 mm, coagulation en 16 min. Injection:

30 sec. après: Pression 47 mm Coag. en 26 min.

5 min. " " 18 "

10 " " Pression 45 mm " " 5 "

Cette expérience ou la dose de peptone a été plus petite et celle de sérum plus grande, de même que dans une autre analogue mais où le délai avait été de 3 $\frac{1}{2}$  jours, nous montre des phénomènes anaphylactiques très faibles: la chute de la pression est nulle; la réaction se montre surtout par les manifestations thromboplastiques.

39. Lapin de 2 kg, reçoit 0.1 g de peptone de Witte dans la veine de l'oreille, puis 48 heures après, 0.2 g de la même peptone additionnés de 0.05 g de leucine.

Pression 82 mm, coagulation en 40 min. Injection, suivie de quelques fortes oscillations, mais

1 min. après:	Pression	80 mm	
2 $\frac{1}{2}$ "	"	"	78 " coag. en 45 min.
5 "	"	idem	

2<sup>e</sup> injection:

30 sec. après:	Pression	42 mm	
2 min. "	"	"	48 " coag. en 18 min.
4 "	"	"	72 "

## II. Anaphylaxie passive.

Les prévisions qui nous avaient fait adopter les délais de 24 et 48 heures entre l'injection préparatoire et l'épreuve anaphylactique, s'étant trouvées vérifiées par l'expérience, nous nous sommes servi, pour nos essais d'anaphylaxie passive de sérums recueillis après les mêmes délais.

Le sérum I provient de la saignée d'un lapin de 2 kg qui avait reçu 48 heures auparavant 0.1 g de peptone de Witte dans la veine auriculaire; le sang qui a fourni le sérum coagulait en 25 minutes.

Le sérum X a été obtenu dans les mêmes conditions, mais après 24 heures seulement; le sang correspondant coagulait en 10 minutes.

44. Lapin de 2 kg, reçoit 0.2 g de peptone de Witte et 4 cc. de sérum I, le tout en 8 cc.; la seconde fois 0.2 g de peptone.

Pression 49 mm, coagulation en 10 min.

10 sec. après débute une chute forte.

1 min. après:	Pression	12 mm	
2 "	"	"	15 " coag. en 30 min.
5 $\frac{1}{2}$ "	"	"	44 "

2<sup>e</sup> injection:

1 min. après:	Pression	10 mm	
2 "	"	"	38 " coag. en 8 min.

45. Lapin de 2 kg, reçoit 0.2 g de peptone de Witte additionnés de 4 cc. de sérum I et de 0.12 g de leucine.

Pression 58 mm, coagulation en 4 min.

15 sec. après: Pression 22 mm

1 min.	"	"	16 "	
2 "	"	"	14 "	coag. en 8 min.
2 1/2 "	"	"	l'animal succombe	

46. Lapin de 2 kg, reçoit 0.2 g de peptone de Witte additionnés de 2.5 cc. de sérum I frais et de 0.1 g de leucine; la seconde fois 0.2 g de peptone seule.

Pression 59 mm, coagulation en 9 min.

40 sec. après: Pression 27 mm

2 min.	"	"	39	"	coag. en 30 min.
6	"	"	46	"	" " 7 "

**2e injection :**

20 sec. après: Pression 12 mm, coag. en 2 min.

30 " " " 10 " " " 2 "

3 1/2 min.	"	"	20	"	"	"	3	"
------------	---	---	----	---	---	---	---	---

la pression continue à se relever lentement.

47. Lapin de 2 kg, reçoit 0.2 g de peptone de Witte additionnés de 2 cc. de sérum X frais et de 0.1 g de leucine; la seconde fois 0.2 g de peptone seulement.

Pression 54 mm, coagulation en 25 min.

20 sec. après débute une chute

1 min. après: Pression 27 mm

2	"	"	"	48	"	coag. en 15 min.
4	"	"	"	58	"	

**2<sup>e</sup> injection:**

30 sec. après : Pression 29 mm

2½ min. " " 35 "

48. Lapin de 2 kg, reçoit une injection de 2 cc. de sérum anaphylactisant X dans la jugulaire 3<sup>1</sup>/<sub>2</sub> min. avant la peptone (0.2 g additionnés de 0.1 g de leucine).

Pression 58 mm, coagulation en 12 min.

30 sec. après: Pression 45 mm, puis remonte

3 1/2 min.	"	"	56	"
------------	---	---	----	---

2<sup>e</sup> injection (peptone):

20 sec. après : Pression 48 mm

4 min. „ „ 51 „ coag. en 1 $\frac{1}{2}$  heure.

**49.** Lapin de 2 kg, reçoit 2.5 cc. de sérum X, 3 minutes avant l'injection de peptone (0.2 g de peptone de Witte additionnés de 0.1 g de leucine).

Pression 52 mm, coagulation en 7 min.

25 sec. après: Pression 43 mm

2 min.    "                    44    "    coag. en 4 min.

3        "        "        "        44        "

2<sup>e</sup> injection (peptone additionnée de leucine): la courbe des pressions n'est pas modifiée.

3 min. après: Pression 44 mm coag. en 27 min.

6	"	"	"	44	"
---	---	---	---	----	---

3<sup>e</sup> injection (peptone additionnée de 0.1 g de leucine):

1<sup>1/2</sup> min. après: Pression 44 mm coag. en 9 min.

50. Lapin de 2.5 kg, reçoit 1.7 cc. de sérum X recueilli depuis 48 heures, additionné de 1.3 cc. de sérum-complément de lapin, puis après 4 min., un mélange de 2.5 cc. de 0.2 g de peptone et de 0.1 g de leucine. La 3<sup>e</sup> injection n'est composée que de 0.2 g de peptone seule.

Pression 60 mm, coagulation en 4 min. Injection de sérum: la pression tombe rapidement mais très brièvement à 50 mm, et remonte vite à 58 mm.

4 min. après: Pression 58 mm, coag. en 16 min.

2<sup>e</sup> injection: chute lente

1½ min. après: Pression 42 mm, coag. en 5 min.

6 min. „ „ 54 „

3<sup>e</sup> injection: chute rapide et forte.

45 sec. après: Pression 32 mm

1 min. „ „ 32 „ incoagulable.

### III. La propriété anaphylactisante du sérum est entraînée par la coagulation.

Par nos expériences sur l'intoxication protéinique chez le lapin, nous avons établi la nécessité de l'intermédiaire du complexe leucine-complément.

Il était donc logique de supposer que l'action d'un sérum anaphylactisant soit due à l'existence dans ce sérum de complexe leucine-complément.

On conçoit que ce sérum perde son activité dans les conditions où le complément disparaît: soit en vieillissant, soit par le chauffage. La coagulation à 75° C permet de séparer une partie liquide qui n'est pas anaphylactisante. Quant à l'autre partie, le coagulum, nous allons voir qu'elle renferme la propriété anaphylactisante, laquelle n'est pas détruite, mais entraînée par la coagulation, ce qui plaide pour l'existence réelle du complexe leucine-complément: la leucine ne se trouverait pas dans le sang comme telle, c'est à dire comme substance relativement simple, mais liée au complément.

En effet, ce précipité de coagulation, ajouté à la peptone est inactif; il manque le facteur complément que la chaleur y a détruit ou tout au moins dissocié, alors que les acides aminés tels que les leucines résistent à 100° C. Si on ajoute, au contraire, du sérum-complément à ce précipité, on réunit de nouveau les conditions requises et on observe les phénomènes habituels de l'intoxication protéinique.

**51.** Lapin de 2 kg, reçoit 0.2 g de peptone de Witte additionnés de 1 g du précipité, deux fois successivement.

Pression 51 mm, coagulation en 20 min.

1<sup>e</sup> injection : pas de modifications.

2<sup>e</sup> injection : 4 minutes plus tard, pas de modifications.

Pression 52 mm, coag. en 20 min.

**52.** Lapin de 2 kg, reçoit 0.2 g de peptone de Witte additionnés de 1 g du précipité et de 1 cc. de serum-complément de lapin.

Pression 52 mm, coagulation en 10 min. L'injection est suivie d'une oscillation, puis atteint.

20 sec. après, pression 43 mm

4 min. " " 48 " coag. en 15 min.

11 " " " 38 "

12 " " " 8 "

14 " " " " " 20 "

18 " " " 18 " " " 30 "

En somme, dans l'état d'anaphylaxie active le lapin se comporte vis-à-vis de la peptone de Witte tout comme le chien normal. L'enrichissement de la peptone en leucine aggrave notablement les effets de l'injection d'épreuve. L'addition d'un sérum normal diminue la soudaineté du phénomène, mais l'action thromboplastique se traduit cependant par l'augmentation de la coagulabilité du sang.

Dans l'anaphylaxie passive l'addition de leucine à la peptone de l'injection d'épreuve augmente fort l'intensité et la rapidité des phénomènes anaphylactiques.

La force de l'intoxication est naturellement influencée par la quantité de sérum anaphylactisant que l'on ajoute à la peptone. Quand l'injection de sérum passivement anaphylactisant devance celle de la peptone, de plusieurs minutes, l'effet se réduit à un minimum.

#### IV. Considérations d'ensemble.

On sait que l'on peut anaphylactiser les animaux contre les diverses protéines; une première injection, même à petite dose, les rend hypersensibles et les fait réagir même à une protéine qui sinon ne serait pas toxique pour eux.

Déjà d'une première série de nos expériences se dégage un fait très important: si au moment de l'épreuve anaphylactique on ajoute de la leucine au produit à injecter, l'effet en est considérablement accru. L'adjonction supplémentaire de sérum frais, influe moins.

Par nos expériences d'intoxication chez le lapin, nous avons établi la nécessité de l'intermédiaire du complexe leucine-complément. Il était donc logique de songer à attribuer l'action d'un sérum anaphylactisant à l'existence, dans ce sérum, du complexe leucine-complément. On conçoit que ce sérum perde son activité en vieillissant et surtout par le chauffage. La coagulation par la chaleur à 75° C permet de séparer une partie liquide qui n'est pas anaphylactisante et un précipité de coagulation, lequel ajouté à la peptone, est inactif, mais qui le devient dès qu'on le recomplete par du sérum frais.

En somme, le lapin anaphylactisé se comporte vis-à-vis de la peptone de Witte tout comme le chien normal. L'enrichissement de la peptone en leucine aggrave notablement les effets de l'injection d'épreuve. L'addition de sérum normal diminue la soudaineté du phénomène, mais l'action thromboplastique se traduit cependant nettement par l'augmentation de la coagulabilité du sang.

Dans l'anaphylaxie passive, l'addition de leucine à la peptone de l'injection d'épreuve augmente fort l'intensité et la rapidité des phénomènes.

Toutes les variations que l'on fait subir au double facteur leucine-complément ou à ses constituants se répercutent par des différences dans la force et dans la rapidité des manifestations toxiques. On peut donc en déduire que ces facteurs interviennent dans l'anaphylaxie.

Dans les expériences chez le lapin nous avons entrevu des différences partielles entre les compléments de divers animaux quant à leurs affinités. On peut d'autre part se figurer l'existence de variétés presque innombrables d'acides aminés, si par leur dérivation de protéines différentes, ils ont encore une composition suffisamment complexe pour rappeler leur origine.

Après avoir établi dès 1907 le rapprochement entre l'anaphylaxie et l'intoxication propeptonique, nous complétons maintenant ce rapprochement en le précisant, à la lumière des faits nouveaux que nous venons d'exposer.

On peut dès lors concevoir le mécanisme de l'anaphylaxie de la façon suivante: l'injection préparatoire introduit directe-

ment ou permet la production d'acides aminés par voie de désintégration de l'albumine injectée. Le complément, doué d'une affinité plus ou moins grande pour ces acides aminés préexiste et la possibilité de la formation du complexe se trouve ainsi réalisée: il y aurait donc anaphylaxie dès que les éléments du complexe acides aminés-complément (pour la spécificité voir plus loin) se trouvent réunis, et cet état commencerait dès qu'il n'est plus équilibré par l'antianaphylaxie passagère, et durerait aussi longtemps que l'organisme n'a pas poussé la désintégration plus loin et éliminé tout résidu de la protéine.

Les substances introduites d'une façon parentérale dans l'organisme arrivent d'abord dans l'oreillette droite du cœur et de là dans la petite circulation. Il s'en suit que c'est dans cette partie importante de l'appareil circulatoire que s'exerce l'action thromboplastique des protéines injectées, donnant ainsi au phénomène le plus caractéristique et le plus connu du choc anaphylactique son allure grave et dangereuse.

L'animal va succomber à cet ictus vasomoteur qui se produit dans un organe essentiel à la vie, à moins que la sécrétion d'antithrombine n'arrive assez tôt et assez abondamment pour libérer les vaisseaux thoraciques: dans ce cas l'animal se remet.

La spécificité s'explique assez facilement: elle dépend de l'acide aminé, encore plus ou moins complexe tel qu'il dérive de la protéine en voie de désintégration; on comprend que cette spécificité n'ait pas de limites trop étroites; on sait par exemple que le lait anaphylactise vis-à-vis de lui-même et vis à vis de diverses protéines bovines. Comme les albumines auxquelles certains animaux sont normalement sensibles, sont précisément de celles dont ils se nourrissent, on peut concevoir que leur organisme renferme constamment une certaine quantité du complexe complément-acide aminé correspondant et que ces animaux sont normalement dans un état d'anaphylaxie plus ou moins accusé vis-à-vis de ces substances. On sait d'ailleurs qu'un chien en voie de digestion carnée peut être insensible à une injection de peptone: il est momentanément antianaphylactisé.



Notre interprétation du phénomène fournit la clef pour la compréhension des divers faits connus par l'étude de l'anaphylaxie.

La toxogénine, la sensibilisine ne seraient que le complexe complément-acide-aminé.

Une albumine chauffée ou altérée peut anaphylactiser puisqu'elle peut encore donner des acides aminés plus ou moins spécifiques (thermostabilité de la propriété anaphylactisante), mais être déjà trop modifiée pour se combiner aux facteurs préparés dans l'organisme et produire le choc anaphylactique.

L'absorption de complément au moment de l'intoxication, fait partie intégrante de notre interprétation.

Le mélange in vitro de protéine, anticorps (sérum anaphylactisant) et complément, qui produirait l'anaphylatoxine de Friedberger, ne fait que réunir les facteurs que nous savons maintenant être nécessaires à l'éclosion de l'intoxication. L'anticorps renferme l'acide aminé et, s'il est frais, le complément.

Il est probable que les conceptions de peptozyme de Pick et Spiro et de vasodilatine de Popielsky, qui devaient correspondre à des substances que l'on trouverait dans la peptone de Witte et dans d'autres protéines, expriment simplement l'intensité de l'action thromboplastique de la protéine, laquelle est fonction et du type de la protéine et des éléments du complexe acide aminé-complément qui lui sont nécessaires et qu'elle peut trouver disponibles.

Les divergences entre Arthus et Weichardt au sujet de la production d'antianaphylaxie par la glyocolle, l'alanine etc., tient probablement à la trop grande pureté des produits employés par Weichardt; nous savons en effet que ces corps ne sont que peu thromboplastique par eux-mêmes, et incapables de provoquer une sécrétion d'antithrombine.

L'état d'anaphylaxie est donc celui qui réunit au mieux les conditions où une protéine injectée développe son action thromboplastique, c'est-à-dire qu'elle trouve en quantité suffisante le complexe complément-acide aminé apparenté, et par la même suffisamment spécifique. Le choc anaphylactique est

l'expression de cette action thromboplastique dans son maximum d'intensité et de soudaineté. Il constitue la manifestation la plus brutale de la première partie de la réaction de l'organisme contre l'introduction de protéines étrangères; la suite de cette réaction, la sécrétion d'antithrombine et le sort ultérieur de l'albumine injectée, feront l'objet d'un travail suivant.

### Zusammenfassung.

I. Aus einer ersten Reihe von Experimenten ergab sich, daß Lipoide und Kolloide (Lecithin, Protagon, Cerebrin, Cholesterin) ohne Einfluß auf die bekannte Peptonvergiftung sind. Von den Aminosäuren wirken im Gegenteil einzelne (Tyrosin, Leucine, welche mit Pepton klare Lösungen geben) auf die Symptome erschwerend, andere dagegen (Leucine, welche mit Pepton nur trübe Aufschwemmungen geben) vermindern.

II. Wenn man nun die mittels verschiedene käuflicher Peptone erhaltenen spymographischen Kurven miteinander vergleicht, zeigt es sich, daß die charakteristischsten Kurven durch das Wittesche Pepton gegeben werden; das Grüblersche Pepton (Hemialbumose) übt eine ähnliche Wirkung aus. Cornelisches Pepton schließt sich ziemlich diesen beiden an; andere Peptone Chapoteaut, de Nayer, Defresne) weichen mehr oder weniger ab.

Vergleicht man nun die Kurven mit den Resultaten der chemischen Analyse (cf. Tabelle), so ergibt sich, daß:

1) die Peptonvergiftung nicht von der Acidität der Produkte abhängt: alle reagieren sauer, die sauersten sind nicht die wirksamsten.

2) Der absolute Gehalt an Aminosäure hat keinen direkten Einfluß, z. B. das de Nayersche Pepton enthält 75 Proz. Aminosäure und ist wenig aktiv. Wir wissen übrigens (§ 1), daß die Aminosäuren selbst nur eine geringe Wirkung auf den Blutdruck haben, jedoch die Gerinnung verzögern und eine gewisse Peptonimmunität verleihen.

3) Auch die eigentlichen Peptone sind für die Vergiftungssymptome nicht verantwortlich; das Defresnesche Pepton, das über 30 Proz. echte Peptone enthält, hat eine viel weniger charakteristische Wirkung als das Wittesche Pepton.

4) Die Albumosen, in ihrem Ganzen oder je nach ihrem Gehalt an Proto- oder Deuteroalbumosen, sind ohne direktes Verhältnis zu der Stärke der typischen Vergiftung. Vielmehr war ein Stoff, welcher unter dem Namen „Syntonin Merck“ gekauft wurde, und welcher bei der Analyse hauptsächlich aus Albumosen zu bestehen schien (70 Proz.), als solches angewandt, völlig inaktiv. Es sei jedoch hier bemerkt, daß käufliche Peptone, welche an Albumosen sehr reich (aber nicht zu exklusive) sind, eine besondere Wirkung aufweisen: zuerst steigt der Blutdruck, darauf folgt eine mehr oder weniger ausgesprochene Senkung; schon zugleich mit der Steigung beobachtet man eine große Pulsfrequenz mit sehr kleinen Wellen.

5) Es bleiben die Acid- und Alkalialbumine, für welche ein direkter Zusammenhang zwischen der Quantität und der Stärke der Wirkung besteht. Das Wittesche und das Grüblersche Pepton sind nämlich an löslichen und koagulablen Albuminen am reichsten (cf. die Tabellen der Analysen).

Diese ersten Schlußfolgerungen stimmen ziemlich gut mit denen von früheren Autoren überein.

Aber die chemische Analyse hat uns gezeigt, daß sämtliche Peptone Aminosäure, und zwar in sehr verschiedenen Mengen, enthalten. Andererseits lassen die Untersuchungen mit dem so bezeichneten „Syntonin Merck“ die große Wichtigkeit des Zusammentreffens mit Aminosäure vermuten, denn ein ungiftiges Produkt wird aktiv durch dessen Zufügung.

Hier tritt demnach ein höchst wichtiger Faktor zum Vorschein, die Proteïnen brauchen das Vorhandensein eines gewissen Quantum Aminosäure, um ihre giftige Wirkung ausüben zu können; dieselbe sind als eine Art „Zwischenkörper“ zwischen den Proteïnen und dem Organismus anzusehen. Sämtliche Abbauprodukte der Eiweißstoffe sind wirksam; das Bedürfnis an Aminosäure ist aber sehr verschieden: so enthält z. B. das so wirksame Wittesches Pepton 23 Proz. Aminosäure und durch die Zufügung von zehnfach soviel Aminosäure nimmt die Giftigkeit ab. Andererseits ist das Vorhandensein von mindestens 25 Proz. nötig, um die Wirkung des Syntonins Merck (Albumosen) wachzurufen, und dieselbe

wird durch 125 Proz. Aminosäure noch gesteigert. Es ist wahrscheinlich, daß die größere Giftigkeit der ersten Abbauprodukte auf das geringere Bedürfnis an Aminosäure zurückzuführen sei.

III. In einer folgenden Reihe von Experimenten gingen wir von bestimmten Eiweißstoffen aus und suchten wir die vorigen Schlußfolgerungen zu bestätigen.

Aus Eiweiß bereitetes Acidalbumin ist wirksamer als das Alkalialbumin. Es muß aber bemerkt werden, daß schon bei der Bereitung sich in beiden gewisse Mengen Aminosäure bilden. Das Zufügen von Aminosäuren (50 Proz. genügen, 250 Proz. steigern noch) verleiht beiden eine erheblich gesteigerte Wirkung.

Weder Eiklar noch Blutserum, in die Venen eines Tieres eingespritzt, haben einen Einfluß auf den Blutdruck. Beide jedoch vermehren die Gerinnungsfähigkeit.

Durch Zufügen von Leucin aber tritt auch mit diesen nicht denaturierten Proteinen eine typische Pepton- oder vielmehr Proteinvergiftung auf. Dieselbe wird aber nicht von einer deutlichen Verminderung der Gerinnungsfähigkeit des Blutes gefolgt.

Es wird jetzt fast allgemein angenommen, daß diese Blutdrucksenkung mit der begleitenden Pulsbeschleunigung und Kleinheit der Wellen auf einer Vasodilatation, durch wandständige Gerinnung auf den Endothelien bedingt, beruhen würde.

Nach unseren Resultaten wäre nun das Leucin der Zwischenkörper gerade für diese thromboplastische Wirkung. Daß die Verzögerung der Blutgerinnung, welche auf eine sekundäre Antithrombinsekretion zurückzuführen wäre, von der ersten Wirkung getrennt auftreten kann, ist selbstverständlich, die Frage wird übrigens weiter erörtert werden.

Das Leucin ist nicht wegen seiner sauren Reaktion wirksam, denn es kann nicht von Mineralsäure noch von Weinsteinsäure ersetzt werden. Es muß aber als Säure vorhanden sein, denn Neutralisierung hebt seine Wirkung auf, neues Zufügen von Leucin ruft aber dieselbe wieder hervor.

IV. Es wird allgemein angenommen, daß das Kaninchen gegen Peptonvergiftung unempfindlich ist. — Das Zufügen von Leucin auf Grund unserer vorigen Versuche hatte keinen Einfluß.

Die Vergiftung muß jedoch möglich sein: man beobachtet sie, wenn das Tier vorher anaphylaktisiert worden ist.

Man weiß durch die Arbeiten von Sleeswijk und von Friedberger, daß bei Gelegenheit des anaphylaktischen Shocks ein großer Verbrauch von Komplement stattfindet. Ohne die Frage aufzuwerfen, ob das Komplement im Blutplasma kreist und in welcher Menge, haben wir versucht, das Komplement (als frisches Normalserum) direkt mit dem Pepton zu injizieren. Das Ziel war erreicht: die Vergiftung tritt hervor mit Blutdrucksenkung, usw.

Schon 0,1 g pro kg genügt; mit 0,25 g pro kg sind die Symptome prägnant. Nach einigen Minuten wird das Blut weniger gerinnbar, manchmal ungerinnbar. Es ist demnach eine Antithrombinsekretion erfolgt, welche aber geringer ist als beim Hund; auch eine wirklich deutliche Peptonimmunität ist ziemlich selten. Die thromboplastische Wirkung der neuen Injektion überschwemmt das vorhandenes Antithrombin.

Das Zufügen von altem, resp. von auf 58° C erhitztem Serum ist wirkungslos. Es ist demnach der als Komplement bezeichnete Teil des Serums, der hier im Spiel ist.

Dagegen ist das Kaninchen für ein vegetabilisches Eiweiß (ein von uns verfertigtes und Aminosäure enthaltendes Glutenpepton) direkt, ohne Zufügung von fremden Komplement, empfindlich. Das Tier scheint für dasselbe ebenso empfindlich wie der Hund für das Wittesche Pepton.

Der Zwischenkörper, von dem im vorigen Abschnitt die Rede war, ist demnach nicht nur das Leucin, sondern ein Komplex von Leucin-Komplement. Dasselbe braucht nicht in großer Menge vorhanden zu sein. Wenn die thromboplastische Wirkung nur einmal angefangen hat, bildet sich durch die stattfindende Koagulation neues Komplement und die Reaktion läuft weiter ab. Ein fremdartiges Eiweiß, wenn

auch in genügender Menge von Leucin begleitet, hat nur geringe Affinität für das Komplement, die Koagulation geschieht äußerst langsam und schwach. Wenn sich auch die Reaktion hierdurch erkennen läßt, zeigt sie jedoch nicht die für eine intensive und sofortige thromboplastische Wirkung charakteristischen Merkmale.

V. Man weiß, daß die Tiere sich gegen die verschiedensten Proteine anaphylaktisieren lassen. Eine erste Injektion macht sie für einen sonst gänzlich inaktiven Körper stark empfindlich.

Schon aus einer ersten Versuchsreihe tritt eine wichtige Tatsache hervor: durch Zufügung von Leucin wird die Wirkung eines injizierten Proteins erheblich verstärkt; komplementhaltiges Serum allein hat weniger Einfluß.

Durch unsere Untersuchungen über die Peptonvergiftung beim Kaninchen wurde die notwendige Vermittlung von beiden, i. e. des Komplexes Leucin-Komplement dargetan.

Beim anaphylaktisierten Tier gibt sich jede Aenderung einer dieser beiden Faktoren durch einen Unterschied in der Stärke oder in der Geschwindigkeit der Vergiftungssymptome kund. Man darf demnach annehmen, daß die beiden Faktoren an der Anaphylaxie beteiligt sind.

Auch bei der passiven Anaphylaxie beobachtet man dasselbe. Ein passiv anaphylaktisierendes Serum, auf 75° C erhitzt, gibt ein Filtrat das völlig unwirksam ist, und ein Koagulum, welches durch sich selbst ohne Einfluß, sich aber durch komplementhaltiges Serum reaktivieren läßt und dann wiederum passiv anaphylaktisieren kann. Dieser Versuch spricht deshalb für das wirkliche Bestehen des Komplexes Aminosäure-Komplement.

Die Experimente beim Kaninchen haben die Verschiedenheit der Affinität der Komplemente je nach der Tierart gezeigt.

Nachdem wir schon 1907 auf Grund unserer damaligen Untersuchungen die Anaphylaxie als eine Peptonvergiftung gedeutet haben, läßt sich jetzt im Lichte obiger neuen Tatsachen die Anaphylaxie folgenderweise noch genauer auffassen.

Durch die sensibilisierende Einspritzung werden in den Organismus Aminosäuren schon fertig hineingeführt, resp. werden dieselben durch weiteren Abbau im Organismus selbst gebildet. Das Komplement mit seiner verschiedenartigen Affinität ist vorhanden, und so kann der Komplex Aminosäure-Komplement zustande kommen. Die Anaphylaxie fängt an, sobald die kurzzeitige durch die Injektion bedingte Antianaphylaxie nicht mehr die Ueberhand hat, und dauert so lange, bis der Organismus durch weiteren Abbau und Exkretion die letzten Ueberreste des Proteins ausgeschieden hat.

Bei einer Prüfungsinjektion ruft die thromboplastische Wirkung schnell einen energischen Shock hervor, weil der Komplex zur Vermittlung vorliegt. Parenteral eingeführtes Eiweiß übt seine thromboplastische Eigenschaft vorerst auf die Gefäße des kleinen Kreislaufs aus und verleiht so dem Shock sein charakteristisches und gefährliches Wesen. Das Tier wird diesem Iktus unterliegen, wenn nicht eine genügende und frühzeitige Antithrombinsekretion die Gefäße befreit und Erholung bringt.

Auch die Spezifizität läßt sich in dieser Weise erklären: sie wird bestimmt durch die Aminosäure. Man kann sich das Bestehen einer unbestimmten Zahl von Aminosäuren vorstellen, falls dieselben durch ihre Abstammung von den verschiedensten Proteinen noch durch Seitenketten kompliziert genug geblieben sind, um ihre Abstammung zu verraten. Uebrigens weiß man, daß die Spezifizität in nicht zu engen Grenzen gefaßt ist; z. B. anaphylaktisiert Milch gegenüber Milch und zu gleicher Zeit gegen andere Rinderproteine.

Man kann sich sehr gut vorstellen, daß der Organismus normalerweise von den gewöhnlichen Nahrungsstoffen abstammende Aminosäure enthält und demnach gegen diese Proteine stets und in wechselndem Grade anaphylaktisiert ist. Man weiß auch, daß der Hund in voller Verdauung für Pepton viel weniger empfindlich ist: er ist zeitweise anti-anaphylaktisiert.

Unsere Erklärung des Phänomens läßt eine sehr einfache Deutung sämtlicher bekannten Tatsachen zu.

Die Annahme eines Toxogenin und eines Sensibilisin entspricht einfach das Vorhandensein des spezifischen Komplexes Aminosäure-Komplement.

Ein erhitztes oder teilweise denaturiertes Eiweiß kann noch Anaphylaxie auslösen, weil es noch Aminosäure bilden kann (Thermostabilität der anaphylaktisierenden Eigenschaft); es ist aber zu viel verändert, um sich noch mit dem aus der ersten Injektion entstandenen Komplex zu verbinden.

Der Verbrauch von Komplement ist gerade ein wichtiger Teil unserer Auffassung.

Wenn Friedberger Protein, anaphylaktisierendes Serum und Komplement miteinander in vitro mengt, braucht er nicht die Bildung eines Anaphylatoxins anzunehmen. Er bringt einfach die nötigen Faktoren zusammen, um den Shock auszulösen.

Die Hypothese von Pick und Spiro eines Peptozyms und die von Popielsky eines Vasodilatins als wirksamer Teil in dem Witteschen Pepton ist überflüssig; sie entspricht wahrscheinlich nur die Heftigkeit der thromboplastischen Wirkung, und dieselbe hängt ab von der chemischen Form des Proteins, von der ihm nötigen Menge Aminosäure und von dem Vorhandensein des Komplexes Aminosäure-Komplement.

Die Anaphylaxie ist der Status, in dem ein injiziertes Protein am besten die Bedingungen, in welchen es seine thromboplastische Wirkung ausüben kann (i. e. eine genügende Menge des Komplexes Komplement-Aminosäure, diese letztere in nicht zu weit abgebauter Form um an ihren Ursprung noch zu erinnern und deshalb spezifisch zu sein) fertig vorfindet.

Der Shock entspricht dieser thromboplastischen Wirkung mit ihrer größten Stärke und Plötzlichkeit.

Es ist die gewaltigste Form des ersten Akts der Reaktion des Organismus gegen die Einführung von fremdem oder denaturiertem Eiweiß. Die folgenden Akte dieser Reaktion, i. e. die Antithrombinsekretion und das Schicksal des injizierten Proteins, werden in einer weiteren Arbeit berücksichtigt werden.



*Nachdruck verboten.*

[Aus dem Institut für Hygiene und Bakteriologie der Universität  
Straßburg (Direktor: Geheimrat Prof. Dr. Uhlenhuth).]

### **Weitere Studien über die wässerigen Organextraktgifte.**

Von Priv.-Doz. Dr. H. Dold und Dr. Sagio Ogata.

(Eingegangen bei der Redaktion am 7. April 1912.)

Während die Giftwirkung wässeriger Extrakte bestimmter Organe auf heterologe Tiere schon ziemlich lange bekannt war (Wooldridge, Pekelharing, Martin, Boggs, Conrad, W. A. Schmidt, Grund, Ascoli, Piorkowski, Weichhardt und Piltz, Freund u. a.), berichteten Brieger und Uhlenhuth im Jahre 1898 wohl zum erstenmal über Giftwirkung von Extrakten aus normalen Organen derselben Tierart bei subkutaner Injektion. Kraus, Volk und Löwenstein machten dann Mitteilungen über Gifte, die, aus tuberkulösen Meerschweinchenorganen durch Extraktion mit physiologischer Kochsalzlösung gewonnen, auf Meerschweinchen bei intravenöser Injektion akut tödlich wirkten. Dieselbe Wirkung konnten die Autoren später auch bei Extrakten aus normalen Meerschweinchenlungen konstatieren. Uhlenhuth, Haendel und Steffenhagen machten weiterhin die Erfahrung, daß Preßsäfte resp. Kochsalzextrakte aus Rattensarkomen, sowie aus normaler Meerschweinchenleber bei intravenöser Injektion für die gleiche Tierart akut tödlich wirkten, und daß durch Berkefeld-Filtration oder Erhitzen auf 60° eine Entgiftung eintrat.

In zwei früheren Arbeiten (Zeitschr. f. Immunitätsf. etc., Bd. 10, 1911, Heft 1/2 und Deutsche med. Wochenschr., 1911, No. 36) konnte dann der eine von uns (Dold) zeigen, daß sich aus allen untersuchten Organgeweben (Lunge, Milz, Leber, Niere, Gehirn, Muskulatur, Hoden, Lymphdrüsen), und zwar sowohl aus normalen wie aus erkrankten (tuberkulösen) Organen von Meerschweinchen, Kaninchen und Menschen, durch kurzdauernde Extraktion mit physiologischer Koch-

salzlösung Gifte gewinnen lassen, welche bei intravenöser Injektion die Versuchstiere (Meerschweinchen und Kaninchen) akut töten, daß es sich hierbei also um ein ganz allgemeines Prinzip handelt, und nicht um Gifte, welche nur dem einen oder anderen Organ — wie dies früher vielfach angenommen wurde — eigentümlich sind. Diese Organextraktgifte erwiesen sich für die homologe Tierart relativ giftiger als für heterologe Tierarten. Es zeigte sich ferner, daß alle diese Gifte durch Zusatz von genügender Menge frischen Serums binnen kurzer Zeit ( $\frac{1}{2}$ —1 Stunde) entgiftet wurden, und zwar stellte sich dabei heraus, daß auch bei dieser Entgiftung das homologe Serum wirksamer war als ein heterologes<sup>1)</sup>. Tuberkulöse Tiere zeigten zum mindesten keine starke Ueberempfindlichkeit gegenüber Extrakten aus tuberkulösen Organen.

Durch Zusatz von Kaolin könnte man die giftigen Organextrakte (wahrscheinlich durch die an das Kaolin erfolgende Adsorption der Giftstoffe) ebenfalls entgiften. Ferner konnte gezeigt werden, daß das frische Serum durch Filtration durch ein Berkefeld-Filter seine Fähigkeit, die Organextrakte zu entgiften, verliert. Bei der Entgiftung der Extrakte durch frisches Serum findet kein Komplementschwund statt, es handelt sich hierbei also wohl nicht um eine Komplement-, sondern eher um eine Ferment- bzw. Antifermentwirkung (wenn man die Giftwirkung der Organextrakte auf ein gerinnungserzeugendes Ferment zurückführen will).

Versuche, Kaninchen gegen ihre eigenen Organgifte zu immunisieren, schlugen fehl. Die Tiere gingen während des Immunisierungsprozesses unter fortschreitendem Kräfteverlust ein.

---

1) Neuerdings berichten Ascoli und Izar (Münch. med. Wochenschr., 1912, No. 20), daß man durch ca. 12-stündige Digestion von untertödlichen Organextraktdosen mit frischem Serum wieder tödliche Gifte erhalten könne. Wir haben diese Versuche an Kaninchen nachgeprüft, haben aber bis jetzt (4 Versuche) keine derartige Beobachtung gemacht. Wir möchten annehmen, daß es sich bei den Versuchen von Ascoli und Izar nicht um Gifte von der Natur der Organextraktgifte, sondern um andere giftige Stoffe (bakterielle Zersetzungen des Serums?, anaphylatoxinartige Stoffe?) handelt.

Weitere Untersuchungen ergaben dann die wichtige Tatsache, daß es zur Gewinnung der Gifte nicht nötig ist, die Organzellen zu zertrümmern; vielmehr genügt es, die Organe, angeschnitten, etwa zwei Stunden lang in physiologischer Kochsalzlösung zu digerieren, so daß Gewebssaft aus den Organen austreten kann, die Kochsalzlösung erweist sich nach Ablauf dieser Zeit giftig. Ferner zeigte es sich, daß, während die Extraktgifte mit Leichtigkeit aus lymphatischen Organen, wie Milz und Lymphdrüsen zu gewinnen sind, aus gewaschenen und zertrümmerten Leukocyten (welche durch Aleuronat aus der Bauchhöhle der Versuchstiere gewonnen wurden), solche Gifte nicht extrahiert werden können. Diese beiden letztgenannten Befunde sprechen dafür, daß die Organextraktgifte in der Hauptsache aus dem extracellulären Gewebssaft der Organe stammen.

Unsere hier mitgeteilten Untersuchungen behandelten zunächst nochmals die Frage, ob es gelingt, durch einfache wässrige Extraktion zertrümmerter freier Körperzellen analoge Gifte wie aus den eigentlichen Organen (im engeren Sinne) zu gewinnen. Wir extrahierten demgemäß große Mengen von Erythrocyten, Leukocyten und rotem Knochenmark von Kaninchen, und prüften die Wirkung solcher Extrakte auf die homologe Tierspecies (Kaninchen).

### **I. Die Wirkung von wässerigen Extrakten aus arteigenen Erythrocyten und Leukocyten.**

Versuch vom 20. XI. 1911.

2 Kaninchen, von 2800 und 2600 g Gewicht, werden entblutet. Das Blut wird in steriler Natriumcitratlösung aufgefangen, sofort zentrifugiert und zweimal mit steriler physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Die ganze Menge der gewaschenen Blutkörperchen (ca. 15 ccm) wird sodann unter Zusatz von etwas sterilem Seesand mit 10 ccm steriler physiologischer Kochsalzlösung im Mörser 20 Minuten lang zerrieben und extrahiert. Nachdem der Brei hierauf scharf zentrifugiert worden ist, wird die überstehende, rot gefärbte Flüssigkeit durch ein Papierfilter filtriert und in einer Menge von 8 ccm einem normalen Kaninchen intravenös eingespritzt.

**Das Tier zeigte zwar einiges Unbehagen, vertrug aber die Injektion dieses starken Blutkörperchenextraktes gut.**

**Versuch vom 20. XI. 1911.**

4 Kaninchen erhalten am 19. XI. 1911 je 10 ccm einer 10-proz. sterilen Aleuronataufschwemmung intraperitoneal injiziert. Nach 24 Stunden Entnahme der Leukocyten durch Auswaschen der Bauchhöhle mit 1,5-proz. Natriumcitratlösung. Hierauf Auszentrifugieren und zweimaliges Waschen der Leukocyten mit physiologischer Kochsalzlösung. Die vereinigten Bodensätze ergeben eine Menge von ca. 5 ccm dicker Leukocytenaufschwemmung. Die Leukocyten werden nun mit feinem Seesand zerrieben und durch Zusatz von 8 ccm steriler physiologischer Kochsalzlösung 20 Minuten lang extrahiert, hierauf zentrifugiert. Die überstehende, leicht gelbliche Flüssigkeit (7 ccm) wird nach Filtration durch ein Papierfilter einem normalen Kaninchen injiziert.

**Das Tier vertrug die Injektion des Leukocytenextraktes gut.**

**Versuch vom 10. III. 1912.**

2 Kaninchen erhalten am 9. III. 1912 je 10 ccm einer 10-proz. sterilen Aleuronataufschwemmung intraperitoneal injiziert. Nach 20 Stunden werden die Tiere durch Entbluten getötet; das Blut wird in steriler 3-proz. Natriumcitratlösung aufgefangen. Hierauf werden die Leukocyten aus der Bauchhöhle mit 1,5-proz. Natriumcitratlösung entnommen. Erythrocyten und Leukocyten werden nunmehr scharf abzentrifugiert und zweimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Die gewaschenen und vereinigten Erythrocyten und Leukocyten, welche zusammen ca. 15 ccm Masse bilden, werden in einer Kälteaufschwemmung bei  $-20^{\circ}\text{C}$   $\frac{1}{2}$  Stunde lang gefroren, dann rasch bei  $+40^{\circ}\text{C}$  aufgetaut, und schließlich im Mörser unter Zusatz von 10 ccm physiologischer Kochsalzlösung 20 Minuten lang verrieben. Der Brei wird scharf zentrifugiert; die gesamte überstehende, stark hämolytische dunkelrote Flüssigkeit (10 ccm) wird einem normalen Kaninchen langsam intravenös eingespritzt.

**Das Tier zeigte vorübergehend leichtes Unbehagen, vertrug aber die Injektion dieses starken Erythrocyten- + Leukocytenextraktes gut.**

**II. Die Wirkung intravenös injizierter arteigener Erythrocyten- und Leukocytentrümmer.**

Der sich beim vorhergehenden Versuch ergebende Rückstand zertrümmerter Erythrocyten + Leukocyten (ca. 15 ccm), welcher eine dicke klebrige Masse bildet, wird mit der gleichen Menge physiologischer Kochsalzlösung (15 ccm) verdünnt. Die Verdünnung (30 ccm) stellt immer

noch eine leicht klebrige dunkelrote Masse dar. Von dieser Blutkörperverdünnung erhält 1 Kaninchen 5 ccm intravenös.

Das Tier macht in den folgenden Minuten und Stunden einen schwer kranken Eindruck (es legt sich auf den Bauch und atmet schwer), erholt sich aber wieder.

Ein zweites Kaninchen erhält 10 ccm der obigen verdünnten Blutkörperchenaufschwemmung intravenös. Das Tier macht nach einigen Minuten einen schwer kranken Eindruck, legt sich auf den Bauch, atmet angestrengt; erhebt sich, taumelt, versinkt in eine Art Koma und geht schließlich nach 20 Minuten unter Streckkrämpfen ein.

Die sofort vorgenommene Sektion dieses Tieres ergab eine starke Hyperämie sämtlicher Organe, besonders der Bauchorgane, keine Gerinnsel in den Gefäßen. (Das Blut in den Mesenterialvenen, der Portalvene, den Nieren- und Lungenvenen und im Herzen war flüssig.)

Die hier mitgeteilten neueren Versuche ergaben also eine Bestätigung der früheren Beobachtung, daß es nämlich nicht gelingt, aus großen Mengen freier Körperzellen, wie Erythrocyten und Leukocyten, in analoger Weise wie aus Organ- gewebe durch wässrige Extraktion akut tödliche Gifte zu gewinnen.

Dagegen wirkte die intravenöse Injektion der Blutkörperchenschatten bzw. zertrümmerten Blutkörperchen und zertrümmerten Leukocyten, welche nach der Extraktion zurückblieben, giftig auf die Versuchstiere. Doch war die Giftwirkung — wie aus den Versuchsprotokollen, und besonders aus dem weiter unten mitgeteilten makroskopischen und mikroskopischen Sektionsbefund hervorgeht — eine ganz andere als die, welche man nach Injektion der wässerigen Organextrakte erhält.

Nach intravenöser Injektion von Organextrakten beobachten wir in der Regel beim Kaninchen ganz akuten Tod (innerhalb 1—3 Minuten), offenbar bedingt — wie wir weiter unten zeigen werden — durch Thrombosierung lebenswichtiger Gefäße, nämlich der Arteriae pulmonales). Bei der sofort nach dem Tode vorgenommenen Sektion findet man — abgesehen

von der aus der mikroskopischen Untersuchung sich ergebenden intravitalen Thrombenbildung in den Lungenarterien — noch im rechten Herzen, in der Portalvene und ihren Wurzelästen Gerinnsel, welche aber anscheinend erst während des Todes oder unmittelbar nachher sich bilden, während das ganze übrige Blut verminderte Gerinnungsfähigkeit bis Ungerinnbarkeit zeigt.

Nach der Injektion von Blutkörperchenschatten erfolgt dagegen der Tod beim Kaninchen nach ca. 15—30 Minuten. In der Zeit zwischen der Injektion und dem Tode zeigt das Versuchstier Zustände von Dyspnoë und Koma.

Der Tod erfolgt unter agonalen Krämpfen. Bei der Sektion findet man nichts von jenem für die Organextrakte so charakteristischen Blut- und Gefäßbild.

Die Organe zeigen zwar, wie dort, allgemein starke Hyperämie, aber die für die Organextraktvergiftung so typischen Thromben in den Lungenarterien und Gerinnseln in den großen Unterleibsvenen (V. portae etc.) fehlen.

Eine genauere Beschreibung des makroskopischen und vor allem des mikroskopischen Sektionsbefundes beim Vergiftungstod durch Organextrakte einerseits und durch Zelltrümmer andererseits folgt weiter unten (Abschnitt VI).

Bei der Injektion von Organemulsionen ist zu bedenken, daß gleichzeitig die Extraktgifte und die giftigen Zelltrümmer, also ganz verschieden wirkende Gifte eingespritzt werden. Dazu kommt die Möglichkeit, ja Wahrscheinlichkeit von multiplen Embolien durch die Gewebspartikel. Das Vergiftungsbild und der Sektionsbefund muß darum in solchen Fällen komplizierter und weniger durchsichtig sein wie nach der getrennten Injektion von wässrigen filtrierten Organextrakten bzw. von extrahierten Organzellrückständen.

Angesichts der großen Differenz, welche sich bei den Extrakten aus den lymphatischen Organen wie Milz und Lymphdrüsen einerseits und aus freien Körperzellen, wie Blutkörperchen (Erythrocyten und Leukocyten) andererseits ergab, war es von Interesse zu erfahren, wie sich in dieser Beziehung das rote Knochenmark junger Tiere, welches gewissermaßen eine Zwischenstellung einnimmt, verhält.

### III. Wirkung von wässrigen Extrakten aus rotem Knochenmark.

Tabelle I.

Menge des extrahierten Organs	Extra- hiiert mit physiol. NaCl	Extrak- tions- dauer	Menge des injizierten filtrierten Extrakts	Injiz. Tier	Wirkung <sup>1)</sup>
1,5 g Knochenmark (aus 4 Femurknochen von Kaninchen)	5 ccm	20 Min.	5 ccm	Kan.	0
3,0 g Knochenmark (aus 6 Femurknochen von Kaninchen)	dgl.	dgl.	dgl.	„	0
3,3 g Knochenmark (aus 6 Femurknochen von Kaninchen)	„	„	„	„	0
9,0 g Knochenmark (aus 12 Femur-, Ulna- u. Radiusknochen von Kaninchen)	10 ccm	„	8 ccm	„	0

Das für diese Versuche benutzte Knochenmark stammte aus Knochen junger Kaninchen. Nach Aufmeißelung der Knochen wurde alles rote Knochenmark herausgenommen. Die Gesamtmenge von rotem Knochenmark, die man von einem jungen Kaninchen (Femur-, Ulna- und Radiusknochen) auf diese Weise erhält, beträgt ca. 2 ccm Masse = ca. 0,75 g.

Es wurden 1,5—9,0 g Knochenmark — wie aus Tabelle I ersichtlich — extrahiert: Die Extrakte zeigten aber in keinem Falle die bekannte Wirkung der Organextrakte.

Der Einwand, daß vielleicht nicht genügend Knochenmark extrahiert wurde, ist kaum berechtigt, da man aus geringeren Organmengen, z. B. aus ca. 5 ccm eines Lymphdrüsenbreies von etwa derselben Konsistenz wie Knochenmark (= ca. 2,5 g Lymphdrüsenbrei) die Gifte regelmäßig bekommt. Es bleibt also nur der Schluß, daß das Knochenmark sich ähnlich verhält, wie die freien Körperzellen (Erythrocyten und Leukocyten). Wie man aus den Blutkörperchenzellen keine Gifte von der Wirkung der Organextrakte extrahieren

1) In diesen und allen folgenden Versuchen wurde der größeren Klarheit wegen nur der Tod der Versuchstiere notiert. Wo das Tier die Injektion überstand, wurde die Wirkung als 0 bezeichnet.

konnte, so auch nicht aus den Zellen des Knochenmarks bzw. aus der Knochenmarkmasse als solcher.

**IV. Die Wirkung von wässerigen Organextrakten aus dem Gesamtauge und aus seinen einzelnen Teilen (Sclera, Retina plus Uvea, Cornea, Linse und Glaskörper).**

Wenn unsere Vermutung richtig war, daß das giftige Agens in den Organextrakten hauptsächlich aus der Gewebslymphe stammt bzw. die Gewebslymphe selbst ist, dann durften nicht bloß — wie im vorhergehenden gezeigt wurde — freie Körperzellen keine solchen Gifte liefern, sondern mußte auch zu erwarten sein, daß die Organgewebe um so weniger Gifte enthalten, je weniger Gewebslymphe sie besitzen. Im Auge und seinen Teilen besitzen wir Organgewebe, welche sich sehr verschieden bezüglich ihres Gehaltes an aktiven Gewebszellen und Gewebslymphe verhalten.

Wir stellten deswegen weitere Extraktionsversuche mit dem Auge und seinen Teilen (Sklera, Uvealkörper, Cornea, Linse und Glaskörper) an, und zwar sowohl mit Kaninchenaugen wie mit Rinderaugen.

R. Wissmann (v. Graefes Arch. f. Ophthalm., Bd. 80, Heft 3) hat ähnliche Versuche mit Augenextrakten angestellt und kam dabei zu Resultaten, welche von den unsrigen — wie wir sehen werden — in verschiedenen Punkten abweichen. Er fand, daß man vollständig negative Resultate erhält, wenn man Linse, Glaskörper, Uvealtraktus und Netzhaut getrennt injiziert und schloß daraus, daß der einzelne Augenbestandteil nicht imstande sei, die Zellen derart schwer zu schädigen, daß erkennbare Krankheitssymptome hervortreten; „es bedarf noch eines zweiten anders gebauten und verschieden wirkenden Zellgiftes, um auf die Tiere krankmachend bzw. tödlich zu wirken“. Aus weiteren Versuchen schloß er dann, daß die Träger der toxisch wirkenden Substanz Uvealtraktus und Netzhaut seien, während Linse und Glaskörper sich als nicht toxische Substanzen erweisen. Jede der beiden toxischen Substanzen (Uvealtraktus und Retina) könnte auch für sich toxisch wirken, „allerdings nur mit einer der nicht toxischen Substanzen (Glaskörper oder Linse) vereint“. Cornea und Sklera wurden von Wissmann nicht getrennt untersucht.

**a) Versuche mit Extrakten aus frischen Kaninchenaugen.**

Ueber die Technik ist nur zu sagen, daß für diese Versuche die Augen frisch getöteter bzw. gestorbener Kaninchen



enukleiert wurden; hierauf wurden die einzelnen Teile des Auges (Cornea, Sklera, Uvea plus Retina, Linse, Glaskörper) getrennt und — wie in der Tabelle II näher angegeben — extrahiert.

Tabelle II.

No.	Extrakt aus	Extrahiert mit phys. NaCl	Extraktionsdauer	Injizierte Menge	Injiziertes Tier	Wirkung
1	8 Kan.-Corneae	6,5 ccm	20 Min.	6 ccm	Kan.	0
2	8 Kan.-Sclerae	dgl.	dgl.	dgl.	„	0
3	8 Kan.-Uveae + Retinae	„	„	„	„	0
4	8 Kan.-Linsen	„	„	„	„	0
5	10 Kan.-Corneae	„	„	„	„	0
6	10 Kan.-Sclerae	„	„	„	„	0
7	10 Kan.-Uveae + Retinae	„	„	„	„	+ 3'
8	10 Kan.-Linsen	„	„	„	„	0
9	12 Kan.-Corneae	„	„	„	„	+ 3'
10	12 Kan.-Sclerae	„	„	„	„	+ 3'
11	12 Kan.-Uveae + Retinae	„	„	„	„	+ 4'
12	12 Kan.-Linsen	„	„	„	„	0
13	12 Kan.-Glaskörper	„	„	„	„	0

Die Tabelle II zeigt, daß 8 und 10 Kaninchen-Corneae, -Uveae plus Retinae, -Sclerae und -Linsen keine akut tödliche Extraktgiftosis liefern; dagegen 10 Uveae plus Retinae. Extrahiert man 12 Kaninchen-Corneae oder -Sclerae, so erhält man ebenfalls eine akut tödliche Dosis; nicht aber durch Extraktion von 12 Kaninchen-Linsen und -Glaskörpern.

Diese Versuche deuten also — wenn man die quantitativen Verhältnisse der einzelnen extrahierten Teile bedenkt — darauf hin, daß Uveae plus Retinae relativ am meisten Giftstoffe enthalten. Dann kommen Sklera und Cornea und schließlich Linsen und Glaskörper, bei denen überhaupt keine tödlichen Giftdosen erhalten werden konnten.

#### b) Versuche mit Extrakten aus frischen Rinderaugen.

Um diese Verhältnisse noch besser an einem leichter zu beschaffenden Material studieren zu können, wurden frisch vom Schlachthof geholte Rinderaugen zu den folgenden Versuchen verwendet (Tabelle III und IV).

Tabelle III.

No.	Extrakt aus	Extrahiert mit phys. NaCl	Extraktionsdauer	Injizierte Menge	Injiziertes Tier	Wirkung
1	1 Cornea + 1 Sclera + 1 Urvealkörper	8 ccm	15 Min.	8 ccm	Kan.	+ 2'
2	4 Uveae + 4 Retinae	dgl.	dgl.	dgl.	„	+ 2'
3	3 Uveae + 3 Retinae	„	„	„	„	+ 4'
4	5 Corneae	„	„	„	„	0 (krank)
5	7 Corneae	„	„	„	„	+ 2'
6	5 Sclerae	„	„	„	„	0 (krank)
7	6 Sclerae	„	„	„	„	+ 2'
8	6 Linsen	„	„	„	„	0
9	12 Linsen	„	„	„	„	0
10	5 Glaskörper	„	„	„	„	0
11	10 Glaskörper	„	„	„	„	0

## c) Versuche mit Kammerwasser aus Rinderaugen.

Tabelle IV.

No.	Injizierte Menge Kammerwasser	Injiziertes Tier	Wirkung
1	3,7 ccm	Kan.	0
2	7 „	„	0
3	10 „	„	0

Die Versuche mit Rinderaugen führten im wesentlichen zu demselben Ergebnis wie die mit Kaninchenaugen. Während man schon aus 3 Uveae plus Retinae eine akut tödliche Gift-dosis extrahieren kann, gelingt dasselbe erst aus 7 Corneae und 6 Sklerae. Andererseits kann man bis zu 10 Glaskörper und 12 Linsen (eventuell mehr, wie die späteren Versuche zeigen) extrahieren, ohne eine genügende Gift-dosis zu gewinnen. Mit anderen Worten: auch diese Versuche mit Rinderaugen weisen darauf hin, daß Uvea und Retina am meisten extrahierbare Giftstoffe, Sklera und Cornea dagegen beträchtlich weniger und Linsen und Glaskörper vielleicht gar keine, jedenfalls aber nur minimale Mengen enthalten.

Höchst bemerkenswert sind auch die Versuche mit Kammerwasser, deren Ergebnisse in Tabelle IV zusammengestellt sind. Selbst Mengen von 10 ccm erwiesen sich bei intravenöser Injektion ungiftig. Wir werden später die Bedeutung dieses Befundes im Zusammenhang mit den anderen Ergebnissen diskutieren.

d) Versuche mit Extrakten aus getrockneten Organen.

Nachdem die bisherigen Versuche mit Extrakten aus frischen Augen gezeigt hatten, daß der Gehalt der einzelnen Teile des Auges an den Extraktgiftstoffen sehr verschieden ist und in starkem Kontrast zur extrahierten Gewebsmasse steht, galt es, möglichst genau quantitativ festzustellen, wieviel Gewebssubstanz bei den einzelnen Teilen des Auges eine akut tödliche Giftdosis lieferte. Da der Wassergehalt der einzelnen Gewebe des Auges sehr variiert, mußte mit der Trockensubstanz der einzelnen Teile (Cornea, Sclera, Retina, Uvealkörper, Linse, Glaskörper) gearbeitet werden.

Die Herstellung der Trockensubstanz geschah in der Weise, daß die einzelnen Teile des Auges, z. B. eine Anzahl von Corneae, möglichst zerkleinert und hierauf im Vakuum bis zur Pulvertrockenheit getrocknet wurden. Dies dauerte ca. 3—4 Tage. Natürlich muß man dabei möglichst unter aseptischen Kautelen arbeiten, um während des Trocknens bakterielle Zersetzungen zu verhüten. Die getrockneten Massen wurden dann gepulvert und in abgewogenen Mengen mit physiologischer Kochsalzlösung stets gleich lange extrahiert, hierauf durch Papierfilter filtriert und injiziert.

Die Herstellung von Glaskörper-Trockensubstanz stieß technisch auf Schwierigkeiten, da bei dem hohen Wassergehalt des Glaskörpers die Trocknung zu lange Zeit in Anspruch nimmt und während dieser Zeit Fäulnis und Zersetzungen sich einzustellen pflegen. Wir mußten deshalb auf das Arbeiten mit Glaskörper-Trockensubstanz verzichten.

Die Extraktgifte erleiden durch die Trocknung eine beträchtliche Abnahme an Wirksamkeit, wie aus der Tabelle V

Tabelle V.

Extrakt aus	Extrahiert mit phys. NaCl	Extraktionsdauer	Injizierte Menge	Injiziertes Tier	Wirkung
1,8 g Kan.-Niere (= 1 Kan.-Niere)	6 ccm	20 Min.	4 ccm	Kan.	Tier krank, erholt sich
2,3 g Kan.-Herz (= 2 Kan.-Herzen)	dgl.	dgl.	dgl.	„	† 2'
1,5 g Kan.-Gehirn (= 1 Kan.-Gehirn)	„	„	„	„	Tier krank, erholt sich

hervorgeht: Während ein Extrakt aus 1 Kaninchenhirn oder 1 Kaninchenniere prompt tötet (wie in den früheren Versuchen gezeigt wurde), ist dies bei dem Extrakt aus der Trockensubstanz von Hirn und Niere nicht mehr der Fall.

Da die Trocknung der verschiedenen Teile des Auges unter denselben Bedingungen und gleich lange erfolgte, so ist anzunehmen, daß diese Abschwächung des giftigen Agens überall eine gleichmäßige war, und darum bei den in Tabelle VI zusammengestellten vergleichenden Untersuchungen nicht gestört hat.

Tabelle VI.

No.	Extrakt aus	Extrahiert mit phys. Koch- salzlösung	Ex- traktions- dauer	Inji- zierte Menge	Inji- ziertes Tier	Wirkung
1	Cornea 0,6 g	10 ccm	20 Min.	6 ccm	Kan.	0
2	" 2,75 "	dgl.	dgl.	dgl.	"	0
3	" 3,5 "	"	"	"	"	+ 3'
4	Uvea + Retina 0,6 "	"	"	"	"	0
5	" + " 2,7 "	"	"	"	"	0
6	" + " 3,0 "	"	"	"	"	+ 2'
7	Sclera 0,6 "	"	"	"	"	0
8	" 1,0 "	"	"	"	"	0
9	" 3,5 "	"	"	"	"	+ 2'
10	Linsen 0,6 "	20 ccm	"	10 ccm	"	0
11	" 20 "	50 "	"	dgl.	"	0
12	" 21 "	50 "	"	"	"	0

Zur Technik der Versuche ist zu bemerken, daß die getrocknete Linsen- und Glaskörpersubstanz sehr gierig das zur Extraktion zugesetzte Wasser (physiologische Kochsalzlösung) unter starker Quellung ansaugt.

Man muß daher, um genügende Mengen Extrakt zu bekommen, beträchtlich größere Mengen von Extraktionsflüssigkeit zusetzen als bei den anderen Teilen des Auges. Durch Kolieren bzw. Auspressen des Linsen- und Glaskörperbreies durch ein Koliertuch erhält man den Linsen- bzw. Glaskörperextrakt. Die unter der Rubrik „Injizierte Menge“ aufgeführten Zahlen bedeuten stets die Maxima der auf diese Weise aus den einzelnen Substanzen erhältlichen Extrakte.

Betrachtet man Tabelle VI, so ergibt sich, daß bei der Uvea und Retina die Menge Trockensubstanz, aus der sich gerade noch eine akut tödliche Giftdosis extrahieren läßt, bei ca. 3,0 g liegt, bei der Cornea und der Sclera bei ca. 3,5 g.

während es aus der ca. 7-fachen Menge Linsen (21 g = 25 Linsen) nicht gelang, eine ebenso wirksame Giftdosis zu extrahieren. Das Ergebnis der Versuche mit Trockensubstanzen steht also im Einklang mit dem Ergebnis der früheren Versuche mit Extrakten aus den frischen Organen: Retina und Uvealkörper enthalten am meisten extrahierbare Giftstoffe, Sclera und Cornea weniger und Linse gar keine oder nur minimale Mengen.

Diese Versuche mit Trockensubstanzen zeigen auch wieder, eine wie starke Abschwächung diese Organgifte durch die Trocknung erleiden. Während man schon aus ca. 7 frischen Rindercorneae eine akut tödliche Giftdosis extrahieren kann, gelingt dies erst aus ca. 3,5 g Cornea-Trockensubstanz (= ca. 25 Rindercornea). Und ganz analog liegen die Verhältnisse beim Uvealkörper und bei der Sclera.

Ueberblickt man die bisherigen Befunde, so gewinnt man entschieden den Eindruck, daß der Gehalt der verschiedenen Organgewebe an den mit Wasser extrahierbaren Giften mit dem Gehalt an aktiven Organzellen und (was damit unzertrennlich verbunden ist) dem Gehalt an Gewebslymphe parallel geht. Besonders deutlich tritt dies am Auge und seinen Teilen in die Erscheinung. Derjenige Teil des Auges, welcher am reichsten an Zellen von größter Aktivität (und darum auch am lymphereichsten) ist, die Uvea und Retina, enthält am meisten Organextraktgifte. Beträchtlich weniger enthält die zellarme und weniger gut mit Blut und Lymphe versorgte Sklera, und ebenso die zellarme Cornea, welche normaliter keine Blutgefäße, dagegen Lymphbahnen und Lymphe besitzt. Am allerwenigsten extrahierbare Gifte (wenn überhaupt) enthielten die Linse und Glaskörper, welche als fast zelllose Organe (Linse) ihren minimalen Lymphgehalt von der Uvea her beziehen. Ebenso wenig giftig erwies sich das Kammerwasser, welches bekanntlich keineswegs einfach als Lymphe, sondern als ein außerordentlich wenig Eiweiß enthaltendes wässeriges Sekretionsprodukt aus den die Oberfläche des Ciliarkörpers überziehenden Zellenlagen der Netzhaut anzusehen ist. Mit anderen Worten: Die Organgewebe scheinen einen um so größeren Gehalt an extrahierbaren Giften zu besitzen, je reger der

Stoffwechsel ihrer Zellen und je größer ihr Gehalt an Lymphe ist.

Da in früheren Arbeiten (Dold) gezeigt werden konnte, daß es zur Gewinnung dieser Gifte nicht notwendig ist, die Zellen der Organe zu zertrümmern, ferner daß sich Gifte von derselben Wirksamkeit aus freien Körperzellen (Erythrocyten, Leukocyten), selbst wenn man große Massen derselben extrahiert, nicht gewinnen lassen, so scheint alles darauf hinzudeuten, daß diese giftigen Organextrakte in der Hauptsache aus der Gewebslymphe stammen.

Die Differenz zwischen unseren Ergebnissen und denen von Wissmann beruht wohl darauf, daß Wissmann die quantitativen Verhältnisse nicht genügend berücksichtigte. Da die einzelnen Teile des Auges einen verschieden großen Gehalt an extrahierbaren Giften besitzen, so müssen, um toxische Extrakt Dosen zu erhalten, von den einzelnen Augenteilen verschieden große Gewebsmassen extrahiert werden.

#### V. Das Verhalten der Versuchstiere bei wiederholter Injektion von Organextrakten.

Schon früher versuchte der eine von uns (Dold) die Versuchstiere gegen ihre eigenen Organextrakte zu immunisieren. Diese Versuche schlugen, wie schon in der früheren Arbeit<sup>1)</sup> mitgeteilt ist, fehl. Dieses Ergebnis war deswegen etwas auffällig, weil wir vor Beginn der Immunisierungsversuche gelegentlich die Beobachtung machten, daß Tiere, welche kurz vorher eine untötliche Giftdosis bekommen hatten, nachher eine sonst tödliche Dosis vertrugen. Die gleichen Beobachtungen machten Bianchi<sup>2)</sup>, ferner Champy und Gley<sup>3)</sup>, welche für diesen Zustand scheinbar rasch auftretender Immunität den Namen „Tachyphylaxie“ und Lambert, Ancel und Bouin<sup>4)</sup>, welche hierfür die Bezeichnung „Skeptophylaxie“ vorschlugen.

1) Dold, Deutsche med. Wochenschr., 1911, No. 36.

2) Cesa Bianchi, Pathologica, T. 3, 15. April, 15. Mai, 1. Juni, 15. Juli.

3) Chr. Champy et E. Gley, C. r. Soc. Biol., T. 70, 22. Juli 1911, p. 159.

4) Lambert, Ancel et Bouin. Ebenda, T. 71, 28. Oktober 1911, p. 350.

Diesen Zustand verminderter Empfindlichkeit nach Injektion untertödlicher Giftdosen veranschaulicht deutlich der folgende Versuch:

1 Kaninchen erhält den Extrakt aus  $\frac{1}{4}$  Kaninchenlunge. Es übersteht die Injektion. Nach  $\frac{1}{4}$  Stunde erhält es den Extrakt aus einer halben Kaninchenlunge (der sonst die Tiere regelmäßig akut tötet). Das Tier verträgt diese Injektion gut.

Diese Art von Immunität ist aber nicht so stark, daß ein Vielfaches der toxischen Dosis vertragen würde, wie der folgende Versuch zeigt:

1 Kaninchen erhält den Extrakt aus  $\frac{1}{4}$  Kaninchenherz intravenös. Es überlebt die Injektion. Nach  $\frac{1}{4}$  Stunde erhält es den Extrakt aus einer ganzen Kaninchenlunge intravenös. Das Tier stirbt unter den gewöhnlichen Erscheinungen in 2 Minuten.

Der Zustand erhöhter Resistenz ist aber nur von kurzer Dauer. Schon nach 24 Stunden ist er in den meisten Fällen wieder verschwunden, während in einigen anderen Fällen noch eine gewisse Resistenzerhöhung besteht, wie die folgenden Versuche zeigen:

1 Kaninchen erhält den Extrakt aus 4 Rindercorneae intravenös injiziert. Es überlebt die Injektion. Nach 24 Stunden erhält es den Extrakt aus 5 Uvealkörpern intravenös. Exitus nach 1 Minute.

1 Kaninchen erhält den Extrakt aus 4 Rindersklerae. Es überlebt die Injektion. Nach 24 Stunden erhält es den Extrakt aus 6 Rindersklerae intravenös. Exitus nach 2 Minuten.

1 Kaninchen erhält den Extrakt aus 2 Uvealkörpern vom Rind intravenös. Es überlebt die Injektion. Nach 24 Stunden erhält es den Extrakt aus einer Kaninchenlunge intravenös. Das Tier überlebt diese sonst tödliche Injektion.

Auch Ancel, Bouin und Lambert<sup>1)</sup> machten diese Beobachtung, daß oft schon nach 24 Stunden die unmittelbar nach der Injektion untertödlicher Dosen auftretende Resistenzerhöhung wieder verschwunden ist.

Damit erklärt sich auch das Fehlschlagen der Immunisierungsversuche, über die in einer früheren Arbeit von Dold berichtet wurde.

---

1) Ancel, Bouin et Lambert, C. r. Soc. Biol., T. 71, 11. November 1911, p. 415.

**VI. Der makroskopische und mikroskopische Sektionsbefund  
beim Vergiftungstod durch intravenöse Injektion von Organ-  
extrakten und von Zelltrümmern.**

**a) Organextrakte.**

Wenn man einem Kaninchen eine letale Dosis irgend-eines wässerigen Organextraktes intravenös einspritzt, so fängt das Tier in der Regel nach  $\frac{1}{2}$ —1 Minute an zu taumeln bzw. umzusinken, es stellen sich meist einige tonisch-klonische Krämpfe ein, das Tier macht Sprünge und geht dann unter den Erscheinungen von Lufthunger nach einigen tiefen Inspirationen ein, wobei es zu Opisthotonus, Exophthalmie, Harn- und Faecesabgang, Verlust der Reflexe, Respirationsstillstand und schließlich zum Herzstillstand kommt. Alles dies spielt sich innerhalb 1—3 Minuten ab.

**Makroskopischer Befund:**

Die sofort vorgenommene Sektion des Tieres ergibt folgendes Bild: Die Bauchorgane zeigen starke Gefäßinjektion. Die Lungen ziehen sich nach Öffnen des Thorax zurück; es besteht keine Lungenblähung oder -starre. Die Farbe der Lunge zeigt keine Besonderheit; gelegentlich finden sich Petechien. In der Regel schlägt das Herz, besonders der rechte Vorhof, noch.

Im rechten Herzen finden sich fast regelmäßig Gerinnsel, ebenso in der V. cava inferior, besonders aber auch in der V. cava und ihren Wurzelästen, den Mesenterialvenen etc. Vom rechten Herzen lassen sich die Gerinnsel in die Lungenarterien bis tief in die kleinsten Lungenarterienäste hinein verfolgen.

Alles übrige Blut ist ungeronnen und zeigt eine auffallende Abnahme der Gerinnungsfähigkeit; es kann mitunter tagelang ungeronnen bleiben.

Sonstige Veränderungen lassen sich makroskopisch an den Organen nicht feststellen.

**Mikroskopischer Befund:**

In zahlreichen Fällen wurden von den Organen (Lunge, Herz, Leber, Niere) der eingegangenen Kaninchen zum Zwecke



einer genaueren histologischen Untersuchung Schnitte angefertigt. Die Organe wurden meist in Formalin gehärtet, mit dem Gefriermikrotom geschnitten und mit Hämatoxylin-Eosin bzw. mit Sudan gefärbt. Daneben wurden auch Paraffinschnitte angefertigt und in derselben Weise mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt.

**Lunge:** Die zahlreichen Lungenschnitte zeigen mit Regelmäßigkeit außer einer beträchtlichen Hyperämie Thrombosierung der großen und mittelgroßen Lungenarterien, und zwar handelt es sich dabei um echte intra vitam entstandene Thromben, wie aus dem Bau und der Schichtung der Gerinnsel ersichtlich ist.

**Herz:** Die Schnitte, welche durch die Atrioventrikulargrenze gelegt wurden, zeigten keine Thrombose der Coronararterien und keine fettige Degeneration. Es bestand nur eine starke Hyperämie.

**Gehirn:** Das Gehirn (Cerebrum und Cerebellum) bot nur das Bild starker Hyperämie; keine Thrombosen.

**Leber:** Die Leber bietet in den Schnitten das Bild einer starken Hyperämie.

Fettige Degenerationen bestehen nicht. In den Aesten der Pfortader finden sich Gerinnsel, welche sich aber nach ihrem Bau als post mortem entstandene Gerinnsel dokumentieren.

**Niere:** In den Schnitten der Niere tritt ebenfalls die Hyperämie deutlich hervor.

Die Epithelien der Harnkanälchen, besonders die der Tubuli contorti, zeigen das Bild der trüben Schwellung. Dagegen besteht keine fettige Degeneration.

Aus dem makroskopischen und mikroskopischen Sektionsbefund geht hervor, daß der Tod der Tiere nach intravenöser Injektion von wässerigen Organextrakten durch Thrombosierung der Lungenarterien erfolgt. Die Gerinnselbildung in den großen Venen erfolgt sekundär und post oder intra mortem.

Die Giftwirkung der wässerigen Organextrakte ist demnach von der des Anaphylatoxins ganz verschieden, und wir halten es deswegen nicht für berechtigt, die Organextraktgifte mit dem Anaphylatoxin bzw. dem anaphylaktischen Gifte zu identifizieren (Aronson, Bauer).

**b) Zelltrümmer.**

Injiziert man einem Kaninchen eine genügende Dosis von Zelltrümmern (Blutkörperchenschatten, Leukocytentrümmer) intravenös, so resultieren nicht die akuten Erscheinungen, die wir bei den Organextrakten kennen gelernt haben. Das Versuchstier geht vielmehr erst innerhalb von ca. 15—30 Minuten zugrunde und zeigt dabei Erscheinungen, welche von denen nach Injektion von Organextrakten sehr verschieden sind. Unmittelbar nach der Injektion zeigt das Tier nur eine beschleunigte und erschwerte Atmung; es legt sich kraftlos auf den Bauch, wird soporös, sucht sich immer wieder aufzuraffen, versinkt aber immer wieder in diesen komatösen Zustand. Mitunter versucht es in einer plötzlichen Erregung zu gehen, taumelt und sinkt wieder kraftlos zusammen. Dieser Zustand dauert 15—30 Minuten. Gegen das Ende zeigt das Tier noch kurze agonale Streckkrämpfe.

**Makroskopischer Befund:**

Die sofort vorgenommene Sektion ergibt ein ganz anderes Bild als das, welches man nach Injektion von Organextrakten zu sehen gewohnt ist.

Zwar findet sich ebenfalls eine allgemeine starke Hyperämie, besonders der Bauchorgane. Aber es finden sich keine Gerinnsel, weder im Herzen, noch in den großen Venen (V. cava inferior und V. cava), noch in den Pulmonalarterien. Ueberhaupt läßt sich pathologisch-anatomisch eine genügende Erklärung für den Tod des Tieres nicht finden.

**Mikroskopischer Befund:**

Auch hier wurden Gefrier- und Paraffinschnitte von den einzelnen Organen (Lunge, Leber, Herz, Niere) zum Zwecke einer genaueren histologischen Untersuchung angefertigt.

**Lunge:** In den Lungen fand sich außer einer starken allgemeinen Hyperämie nichts Besonderes. Vor allem waren keine intravital entstandenen Thromben nachzuweisen.

**Gehirn (Cerebrum und Cerebellum):** Das Gehirn bot das Bild der Hyperämie; Thrombosen fanden sich nicht.

**Herz:** Die Schnitte wurden durch die Atrioventriculargrenze gelegt; es bestand nur Hyperämie, keine fettige Degeneration und keine Thrombose.

**Leber:** Die starke Hyperämie trat auch in den Leberschnitten deutlich hervor. Sonstige bemerkenswerte Veränderungen waren aber nicht vorhanden. Es fand sich in einigen Fällen eine geringgradige fettige Degeneration, besonders in der Peripherie der Lobuli; aber diese fettige Degeneration ist wohl auf die Anwesenheit von Coccidien, welche sich in diesen Lebern fanden, zurückzuführen, da eine solche fettige Degeneration in anderen Fällen, wo die Leber parasitenfrei war, vermißt wurde. Die Gefäße der Leber zeigten keine Thrombosen, wohl aber fanden sich hie und da im Lumen der Gefäße kleine homogene Massen (wahrscheinlich Reste der injizierten Zelltrümmer), umgeben und eingehüllt von Erythrocyten und Leukocyten.

**Niere:** In den Nieren findet sich ebenfalls eine starke Hyperämie. Die Epithelzellen, besonders der Tubuli contorti, zeigen eine trübe Schwellung (beginnende Entzündung). An den Glomeruli ist nichts Besonderes zu bemerken.

Fettige Degenerationen sind nicht nachzuweisen.

Für den Tod der Versuchstiere nach intravenöser Injektion von Zelltrümmern bietet demnach weder der makroskopische noch der mikroskopische Sektionsbefund eine hinreichende Erklärung. Das Vergiftungsbild ist, sowohl klinisch wie pathologisch-anatomisch, ein ganz anderes als das, welches man nach der intravenösen Injektion von Organextrakten beobachtet.

#### VII. Versuche über den Einfluß von Hirudin auf die Wirksamkeit der wässerigen Organextrakte.

Da die deletäre Wirkung der wässerigen Organextrakte auf ihrer gerinnungserregenden Wirkung beruht, lag es nahe, zu versuchen, ob durch Zusatz von Hirudin die Wirkung der Organextrakte aufgehoben wird, wie dies beim Thrombocym z. B. der Fall ist. Wir benutzten für diese Versuche das Hirudin Jacoby.

Wir verwendeten eine Lösung von 0,01 g Hirudin in 2 ccm Kochsalzlösung.

Die Versuche wurden in der Weise angestellt, daß zu den nach der üblichen Methode gewonnenen tödlichen, zur Injektion fertigen Organextraktmengen 10—15 Tropfen obiger Lösung von Hirudin zugesetzt wurde. Nachdem das Hirudin 2—15 Minuten lang eingewirkt hatte, wurde das Ganze (Organextrakt und Hirudin) injiziert. Das Ergebnis dieser Versuche ist in der folgenden Tabelle VII zusammengefaßt.

Tabelle VII.

Extrakt aus	Extra- hiert mit physiol. NaCl	Ex- trak- tions- dauer	Menge des zugeetzten Hirudins	Einwir- kungsdauer des Hirudin	Injiz. Menge	Inj. Tier	Wir- kung
$\frac{1}{2}$ Ka.-Lunge	8 ccm	20'	—	—	8 ccm	Kan.	+ 2'
dgl.	dgl.	20'	10 Tropfen	5'	dgl.	"	+ 2'
"	"	20'	15 "	3'	"	"	+ 3'
"	"	20'	15 "	10'	"	"	+ 2'
—	—	—	15 " (in 8 ccm NaCl)	—	"	"	0

Bekanntlich wird durch Hirudin die gerinnungserregende Wirkung des Thrombozyms neutralisiert.

Die obigen Versuche mit Hirudin zeigen, daß es nicht gelingt, durch Zusatz von Hirudin zu den Organextrakten deren deletäre Wirkung, welche wohl ebenfalls auf der Bildung von Gerinnungen in lebenswichtigen Gefäßen beruht, aufzuheben. Man muß daraus wohl schließen, daß das wirksame Agens in den Organextrakten nicht mit dem Thrombozym identifiziert werden kann<sup>1)</sup>, wie Blaizot<sup>2)</sup> meint.

#### Zusammenfassung.

Die vorliegende Arbeit enthält weitere Versuche über die wässerigen Organextrakte. Die Ergebnisse dieser Versuche lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

1) In Bestätigung früherer Versuche (Dold) konnte nochmals festgestellt werden, daß sich selbst aus großen Mengen freier Körperzellen (Erythrocyten und Leukocyten) durch dieselben Methoden keine Stoffe von der Wirkung der Organextrakte gewinnen lassen.

2) Dasselbe gilt auch vom roten Knochenmark junger Kaninchen.

3) Dagegen wirken die Trümmer der arteigenen Erythrocyten und Leukocyten bei intravenöser Injektion giftig.

Diese Giftwirkung unterscheidet sich aber von der der Organextrakte sowohl durch den Verlauf der Vergiftung als auch durch den Sektionsbefund.

1) Zu ähnlichen Ergebnissen sind Bianchi und Gley (C. R. Soc. Biol., T. 72, 1912, No. 1) gekommen.

2) C. R. Soc. Biol., T. 71, 2. Dez. 1911, p. 534.

4) Aus vergleichenden Untersuchungen mit Extrakten aus verschiedenen Teilen des Auges ergab sich, daß diese Teile bezüglich ihres Gehalts an extrahierbaren Giften sehr differieren: Am meisten Gift enthielten Retina und Uvea, dann kommen Sklera und Cornea. Aus Linse und Glaskörper konnten überhaupt keine tödlichen Gifte extrahiert werden. Auch das Kammerwasser zeigte — selbst in großen Mengen eingespritzt — keine Giftwirkung.

5) Da in einer früheren Arbeit (Dold) gezeigt werden konnte, daß es zur Gewinnung der Organextraktgifte nicht notwendig ist, die Zellen der Organe zu zertrümmern, und ferner, daß sich Gifte von derselben Wirksamkeit aus freien Körperzellen (Erythrocyten, Leukocyten) nicht gewinnen lassen, so bleibt wohl nur die Annahme, daß diese giftigen Organextrakte in der Hauptsache aus der Gewebslymphe stammen.

6) In Bestätigung früherer Versuche von Dold, Bianchi, Champy und Gley, Lambert, Ancel und Bouin wird festgestellt, daß nach Injektion untertödlicher Giftdosen zwar sofort eine erhöhte Resistenz gegen die Extraktgifte eintritt, daß dieselbe aber schon nach 24—48 Stunden wieder verschwindet, so daß eine Immunisierung der Versuchstiere gegen die Organextraktgifte nicht möglich ist.

7) Die Giftwirkung der wässerigen Organextrakte beruht auf ihrer gerinnungserregenden Wirkung. Bei Tieren, welche an der Organextraktvergiftung eingegangen sind, finden sich Gerinnsel in der Portalvene und ihren Wurzelästen, im rechten Herzen und in den Lungenarterien, das übrige Blut ist ungeronnen und bleibt, sich selbst überlassen, tagelang ungeronnen.

Die eigentliche Todesursache ist eine Thrombosierung der Lungenarterien. Durch die histologische Untersuchung konnte festgestellt werden, daß diese Thrombenbildung in den Lungenarterien intravital erfolgt, während die Gerinnsel in der Portalvene usw. postmortal, aber offenbar sehr rasch nach dem Tode (vielleicht noch während des Sterbens) sich bilden.

8) Die Giftwirkung intravenös injizierter Zelltrümmer (Erythrocyten, Leukocyten) ist von der wässriger Organextrakte verschieden. Die Tiere gehen langsamer, unter anderen

Erscheinungen und mit anderem pathologisch-anatomischem Befunde zugrunde.

9) Durch Zusatz von Hirudin zu den wässerigen Organextrakten wird deren giftige Wirkung nicht aufgehoben. Die Annahme, daß die Giftwirkung der Organextrakte nur auf ihrem Gehalt an Thrombozym beruhte, ist demnach nicht berechtigt.

10) Aus dem unter 7) Gesagten geht hervor, daß die Giftwirkung der wässerigen Organextrakte von der des Anaphylatoxins verschieden ist und daß es darum nicht angingig ist, die Organextraktgifte mit dem Anaphylatoxin zu identifizieren.

*Nachdruck verboten.*

[Aus der Königlichen dermatologischen Klinik zu Breslau (Direktor: Geheimrat Prof. Dr. Neisser, zurzeit stellvertretender Direktor: Prof. Dr. C. Bruck).]

### **Ueber die Brauchbarkeit der Bariumsulfatbehandlung von Leichenseren zwecks serodiagnostischer Untersuchung.**

Von **Margarete Stern.**

(Eingegangen bei der Redaktion am 17. April 1912.)

Nach der ersten Publikation von Fränkel und Much<sup>1)</sup> konnte man zu der Annahme berechtigt sein, daß die Erfolge der Wassermannschen Reaktion sich auch auf die pathologische Anatomie ausdehnen würden. Spätere Nachprüfungen einer großen Anzahl von Autoren [Bruck<sup>2)</sup>, Seligmann und Blume<sup>3)</sup>, Schlimpert<sup>4)</sup>, Luksch<sup>5)</sup>, Simmonds<sup>6)</sup>, Lubarsch<sup>7)</sup>, Löhlein<sup>8)</sup>, Vesprémi<sup>9)</sup>, Kref-

1) Münch. med. Wochenschr., 1908, No. 48.

2) Serodiagn. d. Syph., Berlin, Springer, 1909. Folia serolog., Bd. 2, 1910.

3) Berl. klin. Wochenschr., 1909, No. 24.

4) Gesellsch. f. Nat.- u. Heilk. Dresden, 20. III. 1909. Ref. Münch. med. Wochenschr., 1909.

5) Verhandl. d. Dtsch. Pathol. Gesellsch., 1910, p. 249.

6) Ebenda, p. 251

7) Ebenda, p. 251.

8) Ebenda, p. 252; Folia serolog., Bd. 4, No. 3.

9) Centralbl. f. pathol. Anatomie, 1910, p. 193.

ting<sup>1)</sup>, Nauwerck und Weigert<sup>2)</sup> u. a. m.] haben aber sehr verschiedene Resultate ergeben. Die positiven Resultate bei Leichenseren schwanken zwischen 18,7 Proz, bis 58,4 Proz., ja Krefting fand unter 96 nichtluetischen Leichenseren 24 positive. Da also die anfangs günstig erscheinenden Erfolge durch eingehendere Untersuchungen nicht bestätigt werden konnten, ist man von der Anwendung der Wassermannschen Reaktion in der pathologischen Anatomie im allgemeinen zurückgekommen.

Mit umsomehr Freude mußte daher ein Verfahren von Wolff<sup>3)</sup> zu begrüßen sei, das in einfacher Weise ermöglichen soll, bei Leichenseren die spezifischen Hemmungen von der unspezifischen zu unterscheiden, eventuell auch berufen sein könnte, unspezifische Seren von Lebenden (Narkosesera, Sera von Moribunden) zu differenzieren.

Meine Untersuchungen mit der von Wolff empfohlenen Versuchsanordnung erstreckten sich auf 53 Leichenseren. Außerdem habe ich bei 55 Kaninchenseren, die bekanntlich sehr oft positiv reagieren, und 49 Menschenseren, meist syphilitischen Ursprungs, das Wolffsche Verfahren angewendet.

Bezüglich der Technik, die auf Verwendung der Wechselmannschen Bariumsulfatmethode beruht, hielt ich mich genau an die Vorschriften des Verfassers, auch bezüglich der stets frischen Fällung des BaSO<sub>4</sub>.

Wolff hat seine Versuche augenscheinlich mit aktivem Serum ausgeführt.

Er nimmt irrtümlich an, daß die Wechselmannsche Modifikation mit aktiven Seren arbeitet und kommt dadurch zu einer anderen theoretischen Auffassung der Ergebnisse Wechselmanns. Wechselmann<sup>4)</sup> geht bei seinen Versuchen von der Ansicht aus, daß bei der Inaktivierung der Sera Komplementoide auftreten können, die die Verankerung des Meerschweinchenkomplements verhindern, eine Ansicht, die ich auf Grund angestellter Versuche schon früher vertreten habe; durch Digerierung der inaktivierten Sera mit BaSO<sub>4</sub> werden die Komplementoide absorbiert, so daß die Sera wieder bindungsfähig werden. Wolff begründet die größere Anzahl positiver Resultate bei Wechselmann durch die schonendere Behandlung der Sera bei der Inaktivierung. Während bei der Erhitzung

1) Deutsche med. Wochenschr., 1910, No. 8.

2) Münch. med. Wochenschr., 1910, p. 2329.

3) Zeitschr. für Immunitätsforsch., Bd. 11, 1911, p. 154.

4) Zeitschr. f. Immunitätsforsch., 1909, p. 23.

der Sera auf 56° ein Teil der Luesambozeptoren vernichtet würde, wäre das bei der Inaktivierung durch Schütteln mit  $\text{BaSO}_4$  nicht der Fall, so daß also mehr Luesambozeptoren an der Reaktion teilnehmen können. Wolffs Erwägungen treffen aber auf die Wechselmannsche Modifikation nicht zu, da Wechselmann inaktiviertes Serum zur  $\text{BaSO}_4$ -Fällung benutzt, also gar nicht auf eine schonende Behandlung Anspruch macht.

Ich hatte die Nachprüfungen der Wolffschen Befunde zum großen Teil nur mit inaktiviertem Serum angesetzt, da nähere Angaben darüber in der Arbeit des Autors fehlen und er selbst hervorhebt, daß seine Technik nichts anderes darstellt als die Wechselmannsche Modifikation, die eben inaktivierte Sera vorschreibt. Später untersuchte ich aber die Sera inaktiv und aktiv, da ich nach den theoretischen Erwägungen Wolffs annehmen mußte, daß er mit aktiven Seren gearbeitet hat. Auf die Unterschiede, die sich bei gleichzeitiger Prüfung aktiver und inaktiver Sera ergeben haben, werde ich zurückkommen. Nur sei hier bald hervorgehoben, daß ich vor zirka zwei Jahren gelegentlich einer Nachprüfung und Bestätigung der Wechselmannschen Modifikation festgestellt habe, daß das Ausschütteln mit  $\text{BaSO}_4$  keineswegs zur völligen Beseitigung des im Serum enthaltenen Komplements genügt, sondern nur eine Abschwächung desselben bewirkt. Es ist mir damals gelungen, eine Anzahl syphilitischer Sera, die, aktiv untersucht, nach meiner Modifikation der Wassermannschen Reaktion <sup>1)</sup> negativ waren, durch Behandeln mit  $\text{BaSO}_4$  positiv zu machen; wahrscheinlich hat es sich dabei um eine Abschwächung des vorher zu starken Komplements durch  $\text{BaSO}_4$  gehandelt.

Auch bei meinen jetzigen Untersuchungen habe ich gefunden, daß auch Leichensera, selbst wenn sie erst nach 2—3 Tagen p. m. zur Untersuchung gelungen, noch manchmal nach  $\text{BaSO}_4$ -Behandlung Komplement enthalten, das zu einer mehr oder weniger vollständigen Hämolyse genügt.

Nun haben aber Sachs und Altmann festgestellt, daß aktive Sera viel stärker als inaktive reagieren und sie warnen daher mit Recht, aktive Sera ohne weiteres zur serologischen Untersuchung zu verwenden, ohne die Dosierung im Versuch zu ändern. Ich selbst habe, als ich meine Modifikation aus-

1) Zeitschr. f. Immunitätsforschung, 1910.



arbeitete, die auf Verwendung aktiven Serums beruht, ausreichend Gelegenheit gehabt, die Sachs-Altman'schen Befunde zu erhärten, und ich mußte die Extradosis bis auf  $\frac{2}{5}$  der mit inaktivem Serum verwandten Dosis heruntersetzen, um richtige spezifische Resultate zu erhalten. Es liegt daher die Gefahr nahe, daß auch durch Leichensera, die noch Komplement enthalten, wenn sie unter denselben Bedingungen wie inaktiviertes Serum untersucht werden, positive Resultate vorgetäuscht werden können.

#### Leichensera.

Zur Untersuchung gelangten 53 Sera, die ich mit genauen Ergebnissen der Autopsie von dem hiesigen pathologischen Institut erhielt<sup>1)</sup>. Die Sera wurden im allgemeinen 1—4 Tage post mortem geprüft, aber selbst in Ausnahmefällen, in denen sie erst bis 10 Tage post mortem zur Untersuchung gelangten, zeigten die Sera, die bis dahin im Eisschrank aufbewahrt wurden, nur sehr selten Eigenhemmung. Unter den 53 Seren, bei denen kein Lues-Befund notiert worden war, reagierten — inaktiviert untersucht — 10 völlig positiv, während 10 andere Sera eine mehr oder minder starke Hemmung aufwiesen.

Nach Einwirkung von  $\text{BaSO}_4$  trat nur bei einem Falle (Tub. pulm.) eine Umwandlung der vorher positiven in eine negative Reaktion ein, während sie in den 9 übrigen Fällen positiv blieb. Aber auch in dem einen Falle ergab die Paralleluntersuchung mit aktivem Serum nach Behandlung mit  $\text{BaSO}_4$  nur eine ganz geringe Abschwächung der vorher positiven Reaktion. Von 7 Seren, die ohne  $\text{BaSO}_4$  unvollkommene Hemmung aufwiesen, wurde ein Serum nach  $\text{BaSO}_4$  negativ, während zwei andere Sera eine starke Abschwächung der positiven Reaktion zeigten. Die übrigen Sera blieben durch  $\text{BaSO}_4$  unbeeinflusst.

14 Leichensera wurden auch aktiv mit  $\text{BaSO}_4$  behandelt und untersucht. Differenzen haben sich dabei nur in

1) Für die Ueberlassung der Sera gestatte ich mir, Herrn Geheimrat Ponfick und Herrn Privatdozenten Dr. Heinrichsdorff an dieser Stelle meinen besten Dank auszusprechen.

zwei Fällen zwischen aktiven und inaktiven Seren herausgestellt: 1) bei dem schon oben erwähnten Serum vom Tub. pulm., das nach  $\text{BaSO}_4$  inaktiv negativ wurde, während aktiv die positive Reaktion nur unbedeutend abgeschwächt wurde; 2) bei Serum von einer Eklampsie, das — aktiv untersucht — positiv reagierte, während es inaktiv negativ war. Dasselbe wurde nach  $\text{BaSO}_4$ -Behandlung auch aktiv negativ. Ganz entgegengesetzt verhielt sich ein Serum, das von einem Falle von Leukämie stammte. Dasselbe reagierte vor  $\text{BaSO}_4$ -Behandlung — inaktiv untersucht — positiv und aktiv negativ und wurde nach  $\text{BaSO}_4$  auch aktiv positiv. 4 Leichensera blieben vor und nach  $\text{BaSO}_4$ -Behandlung gleichmäßig positiv.

Mithin ist ein völliger Umschlag der Reaktion, wie es bei den Wolffschen Versuchen die Regel ist, nur in zwei Fällen konstatiert worden und auch hier nur entweder mit aktivem oder inaktivem Serum. Die Todesursachen in den Fällen, die unbeeinflusst durch  $\text{BaSO}_4$  positiv blieben, waren in 5 Fällen Tub. pulm. und in den übrigen Fällen Pneumonie, Sepsis puerp., Herzfehler, Leukämie, Eklampsie, Anämie, Ca. oesoph., Herzschwäche, Schädelbruch. Lues war in keinem Falle vermerkt.

#### Kaninchensera.

Von 55 inaktiv untersuchten Seren normaler Kaninchen ergaben ohne Anwendung von  $\text{BaSO}_4$  20 eine vollkommen positive Reaktion, 3 eine unvollkommene Hemmung der Hämolyse. Nach Behandlung der Sera mit  $\text{BaSO}_4$  reagierten drei der vorher positiven und die drei nicht ganz positiven Sera negativ. Da aber diese Sera vor der  $\text{BaSO}_4$ -Behandlung bis auf eine Ausnahme leichte Eigenhemmung zeigten, die nach  $\text{BaSO}_4$  beseitigt war, handelt es sich bei dem Negativwerden der Sera, zum Teil wenigstens, um Aufhebung der Eigenhemmung. Ich habe des öfteren die sowohl von Wolff als von Noguchi beobachtete Tatsache feststellen können, daß leichte Eigenhemmungen der Sera durch Digerieren mit  $\text{BaSO}_4$  aufgehoben werden können.

Mithin kann man sagen, daß bei den unspezifischen Hemmungen der Kaninchensera bestenfalls 30 Proz. der

Fälle durch  $\text{BaSO}_4$  negativ werden, eine Methode, die praktisch also nicht verwertbar ist.

#### **Menschensera.**

Unter 49 Seren, von denen 32 von Luetikern (meist behandelte Fälle) und der Rest von fraglichen Fällen stammte, waren — inaktiv untersucht — 16 Sera positiv, 5 fast positiv.

Von diesen wurden 5 Sera durch Digerieren mit  $\text{BaSO}_4$  negativ, und zwar 4 sichere Luesfälle und ein fraglicher Fall. Ein vorher negatives Serum wurde durch Behandlung mit  $\text{BaSO}_4$  positiv.

Mithin ist die positive Reaktion in fast 20 Proz. bei sicheren Luesfällen negativ geworden, während nach den Versuchen Wolffs niemals ein positives Serum eines Lebenden durch  $\text{BaSO}_4$  seine Reaktion verändert. Unter 18 aktiv untersuchten Seren waren 13 ohne  $\text{BaSO}_4$  positiv, von ihnen zeigten zwei von Luetikern stammende Seren nach  $\text{BaSO}_4$  eine bedeutende Verminderung in der Stärke der Reaktion. Bei den Versuchen mit aktiven Seren muß hervorgehoben werden, daß dieselben auch nach dem Digerieren mit  $\text{BaSO}_4$  reichlich Komplement enthielten, das zu einer fast vollständigen Hämolyse genügte. Man muß zur gänzlichen Entfernung des Komplements das  $\text{BaSO}_4$  länger und intensiver einwirken lassen, als in der von Wolff gewählten Versuchsanordnung verlangt wird.

Meine Untersuchungen haben also ergeben:

1) daß nur ein geringer Prozentsatz von unspezifischen Bindungen von Leichen- und Kaninchenseren durch Digerieren mit  $\text{BaSO}_4$  negativ wird;

2) daß durch dasselbe Verfahren auch ein Teil der spezifischen Hemmungen bei Luesseren aufgehoben wird.

Wolff selbst zitiert am Schluß seiner Arbeit eine Mitteilung von Noguchi und Bronferbrenner<sup>1)</sup>, nach der das  $\text{BaSO}_4$  in sehr großen Quantitäten auch die „Lues-Ambozeptoren“ mitnähme. Es setzt hinzu, daß die Beobachtung für die praktische Anwendung der Reaktion ohne Bedeutung

1) Journ. of exp. Med., Vol. 13, 1911, No. 2.

sei, da dieser Umstand erst bei Anwendung weit größerer Quantitäten von  $\text{BaSO}_4$  eintritt, als bei seiner Versuchsanordnung verwendet wird. Dem scheint aber nicht so zu sein, da meine Nachprüfungen sich an Wolffs Vorschriften gehalten haben. Ich verwende die Wechselmannsche Methode in geeigneten Fällen, um die Verschleierung einer positiven Reaktion aufzudecken. Mir ist bisher die Tatsache, daß durch  $\text{BaSO}_4$  auch gelegentlich eine positive Reaktion negativ werden kann, entgangen, da ich mit der Wechselmannschen Methode immer nur negative Sera, die nach dem Befund und der Anamnese eigentlich hätten positiv reagieren müssen, untersucht habe, während ich bei positiven Seren die Methode nie geprüft habe.

Wolff geht bei seinen Untersuchungen von den Erwägungen aus, daß durch Autolyse hämolysehemmende Substanzen ins Blut kommen und daß je nach der Quantität dieser Substanzen unspezifische Hemmungen oder bei starkem Gehalt Eigenhemmungen der Sera hervorgerufen werden.

Er hält diese hämolysehemmende Substanz, die er in vielen nichtluetischen Leichenseren fand und die auch ab und zu in Seren von Lebenden nachzuweisen ist, für verschieden von der echten, die Wassermannsche Reaktion verursachenden Substanz und für unspezifisch. Er glaubt zu dieser Annahme berechtigt zu sein, weil bei seinen Versuchen stets die unspezifische Reaktion durch Schütteln mit  $\text{BaSO}_4$  zu beseitigen war, während das bei der Reaktion luetischer Sera von Lebenden niemals der Fall war.

#### Zusammenfassung.

Meine Versuche haben die Befunde, die Wolff an einem Material von 260 Seren erhoben hat, nicht bestätigen können. Es kommt wohl ab und zu vor, daß ein Serum — sei es Leichenserum oder Kaninchenserum — seine positive Reaktion durch Schütteln mit  $\text{BaSO}_4$  verliert, da aber dasselbe auch bei sicher positiven Luesseren vorkommt, ist eine Unterscheidung spezifischer und unspezifischer Hemmungen auf diesem Wege nicht durchführbar.

*Nachdruck verboten.*

[Aus dem Hygienischen Institut der Universität zu Budapest  
(Prof. L. v. Liebermann).]

**Bemerkungen zu der Abhandlung von Liefmann, M. Cohn  
und Orloff: Ueber die Hypothese der lipoiden Natur des  
Komplements.**

Von **L. v. Liebermann** und **B. v. Fenyvessy**.

(Eingegangen bei der Redaktion am 12. Juni 1912.)

In einer im Titel genannten Abhandlung (diese Zeitschrift, Bd. 13, p. 150) wenden sich Liefmann, M. Cohn und Orloff gegen unsere Ansichten über die chemische Beschaffenheit des Komplements. Die Autoren fassen ihre Einwände in 14 Punkten zusammen, die wir nun der Reihe nach besprechen wollen:

1. Es fehlt angeblich der Beweis, daß Seifenlösungen oder Seifen-Eiweißmischungen ambozeptorbeladene Blutkörperchen rascher auflösen als nicht beladene. Die Autoren glauben, daß die von uns konstatierte leichtere Löslichkeit sensibilisierter Blutzellen ganz oder teilweise eine Folge des Waschens ist — der mechanischen Schädigung, die die sensibilisierten Blutzellen durch diese Prozedur erfahren — nicht aber die Folge der Sensibilisierung.

Hierauf ist folgendes zu erwidern:

a) Da die mechanische Schädigung, die zu einer beschleunigten Hämolyse durch seifehaltige Lösungen führt, nur die ambozeptorbeladenen Blutkörperchen betrifft, normale aber, wie die Kontrollen beweisen, nicht: so ist es offenbar, daß man es mit einer Wirkung der Ambozeptoren zu tun hat, denn diese waren es ja, die die Erythrocyten so verändert, geschädigt haben, daß sie nun durch seifehaltige Lösungen leichter zerstört werden als normale bzw. mit Normalseris behandelte.

Abgesehen von diesem logisch unanfechtbaren Schlusse, beweisen unsere Versuche<sup>1)</sup>, daß man es nicht nur mit einer

1) Diese Zeitschrift, Bd. 10, p. 491—492.

durch das öftere Waschen der Blutzellen bewirkten allgemeinen Resistenzverminderung zu tun hat (die auch wir betont haben), da der Unterschied in der Geschwindigkeit der Hämolyse sensibilisierter und nicht sensibilisierter Erythrocyten nur bei bestimmten Alkalitätsgraden zur Geltung kommt.

So haben wir z. B. gefunden (Versuch II, l. c. p. 492), daß bei Verwendung eines Gemisches von 1,0 ccm Natriumoleinat 0,1-proz. + inakt. Normalkaninchenserum 0,1 ccm + physiol. NaCl-Lösung 1,8 ccm kein Unterschied zwischen sensibilisierten und nicht sensibilisierten Erythrocyten zu beobachten war, während bei Zusatz von 0,1 ccm  $n_{50}$ -NaOH zu demselben Gemisch sensibilisierte Blutkörperchen komplett, nicht sensibilisierte gar nicht gelöst wurden. Bei etwas höherem, 0,2 ccm, Alkaligehalt nahm der Unterschied wieder ab, um bei Zusatz von 0,4 ccm  $n_{50}$ -NaOH ganz zu verschwinden.

Wäre mit den sensibilisierten Blutkörperchen wirklich nichts anderes geschehen, als daß sie durch öfteres Waschen eine allgemeine Resistenzverminderung erlitten haben, so wären die beschriebenen Erscheinungen kaum verständlich. Es ist klar, daß hier etwas anderes eine Rolle spielt, und dieses ist eben die Ambozeptorwirkung, die eine bestimmte Zusammensetzung der komplettierenden Lösung erfordert und sich nicht mit der Gegenwart eines beliebig zusammengesetzten Lösungsmittels begnügt, wie so etwas bei einer einfachen mechanischen Schädigung zu erwarten wäre.

b) Wir können aber noch zu allem Ueberfluß beweisen, daß der Unterschied in der Geschwindigkeit der Hämolyse durch seifehaltige Lösungen auch dann zu beobachten ist, wenn das von Liefmann, Cohn und Orloff beanstandete Waschen der Erythrocyten unterbleibt. Man muß aber häufig jene störenden Umstände möglichst ausschalten, auf die wir hingewiesen haben und die in dem verschiedenen Seifeninaktivierungsvermögen der zum Vergleich herangezogenen Immun- und Normalsera bestehen. In vielen Fällen gelingt es ohne weiteres, den Unterschied in dem Verhalten sensibilisierter und nicht sensibilisierter Blutkörperchen einfach so zu zeigen, daß man zu den seifehaltigen Lösungen inaktiviertes

Immunserum bzw. Normalserum und die entsprechende Blutemulsion zufügt, wie z. B. im folgenden Versuch:

- 1) 0,2 ccm inakt. Rinder-Kaninchenimmunser. + 2,0 ccm 0,1-proz. Seifenlösg.
  - 2) 0,2 „ „ Normalkaninchenserum + 2,0 „ „ „
- Zusatz von je 1,0 ccm 5-proz. Rinderblutemulsion; 2-stündiger Thermostatversuch. — Resultat: 1) komplett, 2) spurenweise gelöst.

In anderen Fällen müssen die Sera stark verdünnt werden, oder man muß sie genau neutralisieren. Es kommt auch vor, daß die Reaktion nur dann positiv ausfällt, wenn man die Blutkörperchen erst mit den Seren digeriert (um die Ambozeptoren zunächst an die Erythrocyten zu binden) und dann erst die seifehaltige Flüssigkeit zusetzt. Wir führen hierfür folgenden Versuch an:

Bei Verwendung eines bestimmten Immun- bzw. Normalserums wollte der Versuch in der oben angegebenen einfachen Form nicht gelingen; beide Proben wiesen gleich starke Hämolyse auf. Nun haben wir beide (Normal- und Immun-)Sera mit  $n/_{100}$  HCl (unter Verwendung von empfindlichem Lackmuspapier) möglichst genau neutralisiert. Je 2,0 ccm der 20-fach verdünnten neutralisierten Sera wurden mit je 1,0 ccm einer Rinderblutemulsion  $\frac{1}{2}$  Stunde lang im Thermostaten gehalten. Sodann erhielten beide Proben (und zwar zuerst die mit Normalserum) unter stetigem Schütteln, ohne vorheriges Zentrifugieren einen Zusatz von je 0,5 ccm 0,1-proz. Seifenlösung. Nach 1-stündigem Verweilen im Thermostaten war die mit Immunserum angestellte Probe stark hämolysiert, die mit Normalserum gar nicht. Daß wir es hier in der Tat mit der spezifischen Wirkung des Ambozeptors zu tun hatten, konnten wir dadurch beweisen, daß wir denselben Versuch anstatt mit Rinderblut mit Kaninchenblut wiederholten. Diesmal war die Hämolyse in beiden Proben gleich stark.

Bestimmte, für alle Sera geltende Vorschriften lassen sich, wegen ihrer großen Verschiedenheit, nicht geben. Das war ja auch der Grund, weshalb wir es für nötig erachteten, durch Verwendung gewaschener, vorher mit Immun- bzw. Normalseris behandelter Erythrocyten klare Verhältnisse zu schaffen.

Auf Grund der obigen, sowie schon früher mitgeteilter Beobachtungen müssen wir — im Gegensatz zu Liefmann,

Cohn und Orloff — daran festhalten, daß der Beweis, daß ambozeptorbeladene Blutkörperchen durch seifehaltige Lösungen rascher hämolysiert werden als normale, einwandfrei erbracht, der Einwand aber, daß die Resistenzverminderung einfach eine Folge des Waschens wäre, zurückzuweisen ist.

2. Unter Punkt 2 erklären die zitierten Autoren, daß die Seifen-Eiweißmischungen zwar, wie wir gefunden haben, in demselben Sinne spaltbar sind, wie das natürliche Komplement, daß aber diese Spaltung doch anderen Gesetzen folgen soll.

Hierauf haben wir zu erwidern, daß es sich in unseren Versuchen nicht um das „Beschleunigungsphänomen“ handelt. Da dieses Phänomen bekanntlich zuerst von uns beobachtet und beschrieben wurde, verdient diese unsere Feststellung volle Berücksichtigung.

Uebrigens müssen wir erklären, daß dem von den zitierten Autoren mitgeteilten Versuch schon darum keine Beweiskraft zukommt, weil er mit völliger Ignorierung unserer Versuchsanordnung ausgeführt wurde. Mithin können wir uns die Mühe ersparen, auf die Einzelheiten eines Versuches einzugehen, der den Anforderungen der Nachprüfung eines Versuches nicht entspricht.

3. Nach Liefmann, Cohn und Orloff wird Seife auch an nicht sensibilisierte Erythrocyten gebunden, was mit natürlichem Komplement nicht geschieht.

Die Verfasser übersehen hier, daß das nur dann der Fall ist, wenn die Seife für nicht sensibilisierte Erythrocyten nicht gehörig inaktiviert war. Aus ihren inaktiven Kombinationen mit Serumbestandteilen wird aber die Seife — wie das schon U. Friedemann und Fritz Sachs<sup>1)</sup> gefunden haben — von Blutkörperchen nicht aufgenommen. Ja, Friedemann und Sachs fanden in dieser Beziehung keinen Unterschied in dem Verhalten sensibilisierter und nicht sensibilisierter Erythrocyten, was aber — nebenbei bemerkt — durch unsere in Punkt 1 schon besprochenen Versuche widerlegt ist.

---

1) Biochem. Zeitschr., Bd. 12, p. 271.



4. Daß die Seifenwirkung, wie die Verfasser behaupten, in viel geringerem Grade von der Konzentration abhängig ist, wie die des Komplementes, ist kein Einwand, denn es handelt sich, wenigstens vorläufig, nicht um quantitative, sondern um prinzipielle, qualitative Uebereinstimmungen, wie wir das oft hervorgehoben haben.

Uebrigens haben Liefmann und Andreew<sup>1)</sup> selbst, in Anerkennung dieses Prinzips, die Resultate ihrer einschlägigen Versuche schon früher so zusammengefaßt, daß andere Stoffe. — Natronlauge, Seife, Saponin — in der fraglichen Wirkung ein gleiches Verhalten wie das natürliche Komplement zeigen.

5. Ein fernerer Einwand der Autoren ist der, daß die Seife bei stärkerem Blutzusatz weniger, das natürliche Komplement aber mehr Erythrocyten lösen soll.

Die betreffenden Versuche von Liefmann und Andreew, auf die sich die Verfasser beziehen, sind aber zur Demonstration dieses Verhaltens aus verschiedenen Gründen nicht geeignet.

Sie vergleichen zunächst Dinge, die miteinander nicht verglichen werden dürfen, nämlich: nicht sensibilisierte Erythrocyten bzw. ihr Verhalten gegen reine Seifenlösungen mit sensibilisierten Blutkörperchen, auf die komplementhaltiges Serum einwirkt.

Wird der Versuch richtig angestellt, so verhalten sich künstliches und natürliches Komplement ähnlich in dem Sinne, daß bei steigendem Blutkörperchenzusatz die Menge der gelösten Blutkörperchen zunimmt, wie folgender Versuch zeigt:

50 ccm einer 5-proz. Rinderblutemulsion wurden mit der 5-fachen Ambozeptordosis (pro 1 ccm) sensibilisiert, sodann 3mal ausgewaschen und das Sediment auf 5 ccm aufgefüllt. Von dieser 50-proz. sensibilisierten Emulsion wurden die unten angegebenen steigenden Mengen abgemessen und mit physiol. NaCl-Lösung auf je 2,0 ccm ergänzt. Sämtliche Proben wurden mit je 2,0 ccm eines künstlichen Komplementes folgender Zusammensetzung vermischt: 1,0 ccm 0,1-proz. Seifenlösung + 0,25 ccm einer konzentrierten Lösung von Serumalbumin (Merek) + 0,75 ccm physiol. Kochsalzlösung.

---

1) Diese Zeitschr., Bd. 11, p. 358.

Die Proben wurden 1 Stunde lang im Thermostaten gehalten, dann zentrifugiert. Der Hämoglobingehalt der Abgüsse wurde mit dem Fleischl-Miescherschen Hämometer bestimmt und in Skalenteilen des Apparates angegeben.

Blutmenge (50-proz. Emulsion)	Gelöstes Hämoglobin
0,1	360 (komplett)
0,2	368
0,6	400
0,8	490
0,0	570

Noch wichtiger ist es aber, daß die von den Autoren erwähnte Erscheinung nicht für jedes komplementhaltige Serum gilt, also nicht zur Charakterisierung des Komplementes dienen kann, wie aus folgendem Versuch hervorgeht.

Steigende Mengen einer einfach sensibilisierten 50-proz. Rinderblutemulsion wurden mit je 0,2 ccm eines frischen Normal-Kaninchenserums (Komplement) zusammengebracht und 1½ Stunden lang im Thermostaten gehalten. Resultat:

Blutmenge (50-proz. Emulsion)	Gelöstes Hämoglobin
0,1	204 (komplett)
0,2	162
0,4	96
0,6	68
0,8	42
1,0	47

Man sieht also, daß bei Verwendung von Kaninchenserum nicht nur keine Zunahme, sondern im Gegenteil eine beträchtliche Abnahme der Hämolyse bei steigendem Zusatz von sensibilisierten Erythrocyten stattfindet, und doch wird ja niemand behaupten wollen, daß normales Kaninchenserum, das sonst in qualitativer Beziehung mit Meerschweinchenserum übereinstimmt, kein wirkliches Komplement enthält!

Punkt 6 enthält einen Einwand, der auf die unrichtigen Versuche von Gramenitzky gegründet wird. Er wurde von uns bereits widerlegt<sup>1)</sup>.

7. Der Einwand von U. Friedemann und E. Herzfeld ist ebenfalls gegenstandslos geworden, da E. Surányi<sup>2)</sup>

1) Biochem. Zeitschr., Bd. 40. p. 353.

2) Berl. klin. Wochenschr., 1912, No. 9.

nachgewiesen hat, daß ihre Schlüsse bezüglich der Natur der Komplemente unhaltbar sind. Die hieran geknüpfte Bemerkung von Liefmann, Cohn und Orloff (im Nachtrag), daß man, wenn man auch Surányis Versuche gelten läßt, doch sagen muß, daß ja die hämolytisch wirksamen Seifen besonders leicht extrahierbar sind, ist völlig unbegründet, da Surányi direkt nachgewiesen hat, daß sie nach dem Verfahren von Friedemann und Herzfeld nicht extrahiert werden.

8. und 9. Die Einwendungen, daß die Komplementwirkungen durch erhöhten Kochsalzgehalt aufgehoben, die Seifenwirkung aber nur wenig verzögert wird, ferner, daß das natürliche Komplement der Erwärmung auf 56° gegenüber viel empfindlicher wäre, als unsere Seifengemische, sind unrichtig. Beides hängt lediglich von der Zusammensetzung des künstlichen Komplementes ab.

10. Nach den Autoren fehlt jede Lösung des Problems, wie die Seife trotz der im Komplement- und Ambozeptorserum vorhandenen Eiweißstoffe zur Wirksamkeit gelangen könnte. — Versuche für eine derartige Erklärung sind von uns schon früher gemacht worden. Unserem jetzigen Standpunkt entspricht folgendes<sup>1)</sup>:

Das, was Komplement genannt wird, ist nichts anderes als ein kompliziertes und labiles System gewisser normaler Serumbestandteile, wobei Seifen bzw. seifenähnliche Stoffe die ausschlaggebende Rolle spielen, indem diese die Hämolyse vollbringen. Die Bedeutung der sonstigen Bestandteile dieses Systems (Eiweißkörper, Ca., etc.) liegt darin, daß die Seifen durch diese, chemisch oder physikalisch, gebunden und infolgedessen verhindert werden, mit fremden Systemen, die für die Seifen eine geringere chemische oder physikalische Affinität besitzen, reagieren zu können. Ein solches System von relativ geringer Affinität repräsentieren die nicht sensibilisierten Blutkörperchen, während dem Ambozeptor die Rolle zukommt, die chemisch oder physikalisch gedachte Affinität der Zellen für die Seife zu er-

1) Siehe Jahresber. f. Immunitätsf., Bd. 7, Abt. 1.

höhen, und zwar so, daß die Blutkörperchen-Ambozeptorverbindung nunmehr eine größere Affinität zu den seifenartigen Verbindungen besitzt, als jene Serumbestandteile, die die Seife ihrer unmittelbar hämolytischen Wirkung berauben. Die seifenartigen Körper werden also an die sensibilisierten Blutkörperchen herangezogen und es kommt infolge der Seifenwirkung zur Hämolyse. Bezüglich der weiteren Ausführungen verweisen wir auf den zitierten Ort.

Es folgen nun noch 4 Punkte, von denen der eine, der 14., von uns in der soeben erwähnten zusammenfassenden Mitteilung beantwortet wurde. Es wird dort gezeigt, daß Neufelds Einwendungen — wie aus seinen eigenen Angaben hervorgeht — nur für konzentrierte, von uns nie angewendete Seifenlösungen Geltung haben, für verdünnte aber nicht.

Auf die übrigen Punkte 11, 12, 13, die gewisse früher gemachte Einwendungen anderer Forscher einfach aufzählen, fühlen wir uns nicht verpflichtet abermals einzugehen, da sie von uns schon eingehend behandelt wurden.



DATE DUE SLIP  
UNIVERSITY OF CALIFORNIA MEDICAL SCHOOL LIBRARY

THIS BOOK IS DUE ON THE LAST DATE  
STAMPED BELOW

SEP 24 1929

JUN 12 1930

OCT 18 1951

1 m 8, '27



v.13 Zeitschrift für Immuni-  
1912 tättsforschung. 1. Teil.  
Originale. 20578

O. L. Garcke SEP 24 1929 OCT 7 - 1929

W. H. C. Brown JUN 14 1930 JUL 7 - 1930

F. P. White OCT 18 1951 NOV 28 1952

